

Aus der  
Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie der Philipps-Universität Marburg  
Direktor: Prof. Dr. Hinnerk Wulf  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

In Zusammenarbeit mit dem  
Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg

---

# **Histologische Veränderungen in peripheren Nerven nach Injektion eines Lokalanästhetikums im Tiermodell**



## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

**Maik Exner**

aus Rotenburg an der Fulda

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 14.05.14

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: PD Dr. Thorsten Steinfeldt

Koreferent: Prof. Dr. Roland Moll

Welch Schauspiel! Aber ach! Ein Schauspiel nur!  
Wo fass ich dich, unendliche Natur?

*J. W. von Goethe*  
(Faust – Der Tragödie erster Teil)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Hintergrund .....	1
1.2 Ziel der Studie .....	2
1.3 Anatomische Grundlagen .....	2
1.3.1 Makroskopische Anatomie des Plexus brachialis.....	2
1.3.2 Mikroskopische Anatomie des peripheren Nervensystems .....	4
1.4 Pathophysiologische Grundlagen .....	6
1.4.1 Immunologie des peripheren Nerventraumas.....	6
1.4.2 Pharmakologie und Toxikologie von Lokalanästhetika .....	8
1.5 Klinische Grundlagen .....	10
1.5.1 Durchführung peripherer Nervenblockaden.....	10
1.5.2 Komplikationen peripherer Nervenblockaden.....	11
1.6 Studienlage .....	13
1.7 Fragestellung .....	15
 <b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Versuchstiere .....	16
2.1.1 Das Schwein als Modell .....	16
2.1.2 Art und Haltung der Versuchstiere.....	16
2.1.3 Ein- / Ausschlusskriterien .....	16
2.2 Die verwendeten Injektionslösungen.....	17
2.3 Versuchsdurchführung .....	17
2.3.1 Anästhesieeinleitung .....	17
2.3.2 Versuchsgruppen.....	19
2.3.3 Präparation der Nerven.....	19
2.3.4 Axilläre und tibiale Interventionen.....	22
2.3.5 Anästhesie .....	25
2.3.6 Versuchsende .....	25

2.3.7	Ausbau und Fixierung der Nerven .....	26
2.4	Histologische Methoden.....	26
2.4.1	Vorbereitung und Schneiden der Proben.....	26
2.4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	27
2.4.3	Markscheidenfärbung nach Kluver-Barrera .....	27
2.4.4	Immunhistochemische CD68-Färbung .....	27
2.4.5	Färbeprotokolle .....	29
2.5	Statistische Methoden.....	30
2.5.1	Der histologische Trauma-Score.....	31
2.5.2	Fallzahlberechnung.....	31
2.5.3	Auswertung.....	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Versuchtiere .....	33
3.2	Traumatisierung und Aufarbeitung der Nerven.....	33
3.3	Histologische Beurteilung.....	34
3.4	Graduierung der histologischen Befunde.....	41
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>43</b>
4.1	Ergebnisse.....	43
4.2	Ergebnisse im Kontext vorliegender Literatur.....	43
4.3	Limitationen.....	49
4.4	Ausblick.....	51
4.5	Schlussfolgerungen für die klinische Praxis.....	51

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>54</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
 <b>Anhang .....</b>	 <b>61</b>
A) Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	61
B) Abkürzungsverzeichnis .....	62
C) Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	644
D) Danksagung .....	655

# 1. Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Regionalanästhesiologische Techniken werden heute im deutschsprachigen Raum bei etwa 25% der zu operierenden Patienten angewendet (9). Dabei können regionale Betäubungsverfahren, abhängig von Eingriff, ihrer Indikation und des individuellen Risikoprofils des Patienten, eine Allgemeinanästhesie z.T. vollständig ersetzen, oder als adjuvantes Verfahren zur perioperativen Schmerztherapie eingesetzt werden. Der Augenarzt C. Koller führte bereits 1884 Bulbusoperationen nach lokalem Auftragen einer Cocain-Lösung auf die Cornea durch (17). Die Möglichkeit, das Operationsgebiet nur lokal zu anästhesieren, wurde in den folgenden Jahrzehnten in Form gezielter Blockaden peripherer Nerven und neuroaxialer Verfahren weiterentwickelt. In Folge technischer Verbesserungen im Bereich der Allgemeinanästhesie verschwand die Regionalanästhesie zwischenzeitlich fast gänzlich aus der klinischen Praxis (17). Mit Einführung der elektrischen Nervenstimulation in den 1970er Jahren wurde die Regionalanästhesie erneut etabliert (17). Ihr Komplikationsspektrum wird seither zunehmend wissenschaftlich untersucht. Das gilt auch für die Überlegung, die Erfolgsrate peripherer Leitungsanästhesien weiter zu steigern, indem Lokalanästhetika beabsichtigt intraneural appliziert werden (11;36;58;93). Dem gegenüber stehen Erkenntnisse aus mehreren Untersuchungen, die anzeigen, dass Lokalanästhetika potenziell neurotoxisch wirken (1;5;30;38-41;45;49;52;65;78;94-97). Diesbezüglich haben verschiedene Arbeitsgruppen neurologische Beschwerden nach Durchführung peripherer Nervenblockadeverfahren evaluiert (7;8;15;21;29;81). Neurologische Defizite kommen dabei je nach Untersuchung im Bereich von 0,04-3,9% vor (7;8;15;21;29;81). Über 95% der Schadensfälle sind nach 3-6 Monaten vollständig zurückgebildet (15;21;29); dauerhafte Nervenschäden treten somit eher selten auf (15;21;29). Daher postulieren jüngere Studien zu regionalanästhesieassoziierten neurologischen Defiziten, dass die intraneurale Injektion, trotz der potenziell neurotoxischen Wirkung der Lokalanästhetika, als Ursache klinischer Beschwerden von untergeordneter Rolle sei (11;58). Dieser Aspekt wird gegenwärtig kontrovers diskutiert (11;36;58;74).

Die Pathogenese regionalanästhesieassoziierter neurologischer Beschwerden ist bisher nicht vollständig verstanden (2). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass durch eine Nervenblockade eine fokale Neuroinflammation entstehen kann, wenn ein Lokalanästhetikum beabsichtigt intraneural appliziert wird (36;38;40-42;58;70;79;93). Des Weiteren könnte die für die physiologische Funktionalität essentielle Myelinscheide geschädigt werden, was eine Erklärung für schwere neurologische Defizite bei Patienten darstellen könnte (12;56). Dieser Zusammenhang sollte weitergehend systematisch untersucht werden.

## **1.2 Ziel der Studie**

Mit dieser Studie soll überprüft werden, in welchem Ausmaß eine intraneurale Injektion histologische Nervenschäden auslöst. Da eine intraneurale Injektion einerseits mit einem physikalischen Baro- bzw. Volumentrauma, andererseits mit einem chemisch-toxischen Schaden einhergehen sollte, werden beide Faktoren evaluiert. Verglichen werden soll die Wirkung des Lokalanästhetikums Bupivacain gegenüber Ringerlösung. Dadurch könnte gezeigt werden, ob es sich um ein Trauma handelt, das ausschließlich durch die intraneurale Injektion hervorgerufen wird, oder ob Lokalanästhetika aufgrund ihrer potenziellen Neurotoxizität (1;5;30;38-41;45;49;52;65;78;94-97) einen signifikant stärkeren Schaden verursachen.

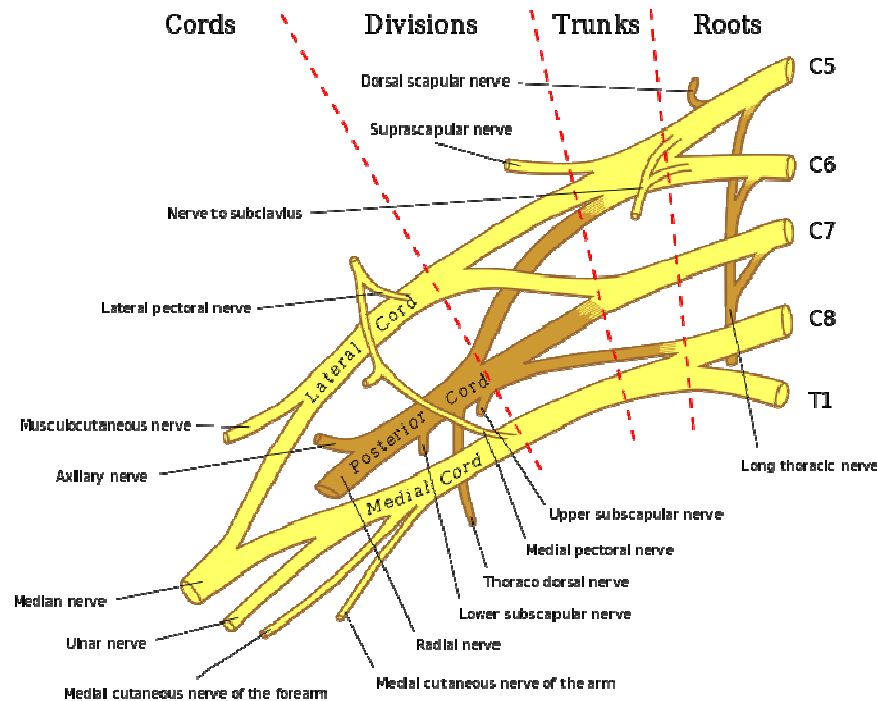
## **1.3 Anatomische Grundlagen**

### ***1.3.1 Makroskopische Anatomie des Plexus brachialis***

Sowohl beim Menschen als auch beim Schwein wird der Plexus brachialis durch die Rami anteriores der Spinalwurzeln C5-C8 gebildet. Je nach Autor werden im humanen System auch in 30-60% der Fälle Faseranteile aus den Elementen C4, Th1 und Th2 eingeschlossen (60;90). Nach dem Austritt aus den Intervertebrallöchern bilden sie im kaudalen Verlauf zwischen Musculus scalenus anterior und medius drei Primärstränge, Truncus superior, medius und inferior als sog. supraklavikulären Plexus brachialis. Nach



Passage der Skalenuslücke zweigen vier Nerven zur Versorgung des Schultergürtels aus dem Geflecht ab.



**Abbildung 1 Makroskopische Anatomie des humanen Plexus brachialis**  
*[modifiziert nach Gray, Henry, aus: Gray's Anatomy, 1. Aufl. 1918]*

Weiter kaudal verlaufen die Trunci nun mit der Arteria subclavia zwischen erster und zweiter Rippe und dem Schlüsselbein nach kaudolateral in die Axilla. Auf dieser Strecke kommt es zur Umverflechtung der Trunci. In der Axilla stellen sie nun drei Sekundärstränge dar. Man spricht vom infraklavikulären Plexus brachialis bestehend aus dem Fasciculus medialis, lateralis und posterior. Aus diesen entstehen schließlich sieben periphere Nerven zur Versorgung der oberen Extremität [s. Tabelle 1; Abb. 1]. Im Gegensatz zum Menschen hat das Schwein kein Schlüsselbein, weshalb die Bildung der peripheren Nerven aus Trunci und Fasciculi über eine kürzere Distanz stattfindet. Innerhalb dieser Nerven sind Unterschiede in der Verteilung der Fasern aus den ursprünglichen Spinalsegmenten im humanen und porcinen System zu vernachlässigen, da Reizantworten porciner Kennmuskeln von den gleichen definierten Nerven wie beim Menschen ausgelöst werden. Beispielsweise wird sowohl die Flexion im

Handgelenk und der Digiti IV und V beim Menschen als auch die Flexion der lateralen Klauenhälfte am porcinen Vorderhuf vom Nervus ulnaris ausgelöst (72;82).

Fasciculus	Nerven Mensch	Nerven Schwein	Kennmuskel und -reflex Mensch	Kennmuskel und – reflex Schwein
Fasc. medialis	N. cutaneus brachii medialis	N. ctaneus brachii medialis	[Th1-Th2]	[Th1-Th2]
	N. cutaneus antebrachii medialis	N. cutaneus antebrachii medialis	[C8-Th1]	[C8-Th1]
	N. ulnaris	N. ulnaris	M. flexor carpi ulnaris - Flexion im Handgelenk und kleinen Finger [C8-Th1]	M.flexor carpi ulnaris -Flexion des lateralen Klauenanteils [C8-th1]
	N. medianus [Radix medialis]	N. medianus [Radix medialis]	M. flexor digitorum prof. [C8-Th1]	Flexion der medialen Klauenhälfte [C7-Th1]
Fasc. lateralis	N. musculocutaneus	N. musculocutaneus	M. biceps brachii - Flexion im Ellenbogengelenk [C5-C7]	Flexion im Ellenbogengelenk [C6-C7]
	N. medianus [Radix lateralis]	N. medianus [Radix lateralis]	Flexion der Digit. I-III, Flexion im Handgelenk [C6-C7]	Flexion der medialen Klauenhälfte [C7]
Fasciculus posterior	N. axillaris	N. axillaris	M. deltoideus - Abduktion im Schultergelenk [C5-C6]	M. deltoideus – Abduktion im Schultergelenk [C5-C7]
	N. radialis	N. radialis	M. extensor carpi radialis – Extension im Handgelenk [C6-C8]	M.extensor carpi radialis – Extension der Klaue [C7-Th1]
Ergänzung:	N. pectoralis medialis	N. caudalis pectoralis[kein Bestandteil des Plexus brachialis]	Mm. pectorales [C5-Th1]	Mm.pectorales [C5-Th1]

**Tabelle 1** Vergleich des humanen und porcinen infraclaviculären Plexus brachialis  
[modifiziert nach Reimers (72) und Sisson(82)]

### 1.3.2 Mikroskopische Anatomie des peripheren Nervensystems

Das periphere Nervensystem bezeichnet den Teil von Nerven- und dazugehörigem Hüllgewebe, der nicht mehr zum Gehirn oder Rückenmark gezählt wird. Sogenannte periphere Nerven führen efferente und afferente Fasern und stellen damit eine Verbindung zwischen zentralem Nervensystem und peripheren Zielorganen dar. Es wird funktionell in ein vegetatives und ein somatisches System eingeteilt, wobei es im Folgenden nur um den somatischen Teil geht. Dieser innerviert die Haut und den Bewegungsapparat (90).

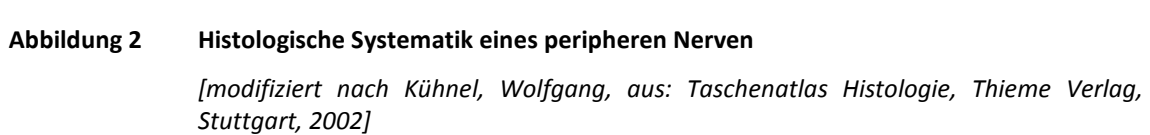
Ein Nerv ist ein Zusammenschluss von Nervenfasern dessen Zellkerne im Spinalganglion und im spinalen Vorderhorn liegen. Die bis zu einem Meter langen Fasern bzw. Axone sind von einem zirkulären, bindegewebigen Hüllsystem umgeben, das hierarchisch organisiert ist: das Epineurium, Perineurium und Endoneurium, von außen nach innen (57;90;92).

Das *Epineurium* wird als Fortsetzung der Dura mater angesehen. Es fasst einzelne Faszikel zusammen, dient durch seinen großen Anteil an Fettzellen und kollagenem Bindegewebe als mechanischer Schutz und führt nervenversorgende Bahnen (Vasa und Nervi nervorum). Weiterhin gehören hierzu elastische Fasern, Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen (57;90;92). Im Bereich des supraklavikulären Plexus brachialis betragen Epineurium und Nervengewebe mengenmäßig etwa gleich viel. Das Epineurium nimmt im distalen Verlauf jedoch ab und steht im infraklavikulären Plexus im Verhältnis 1:2 zum Nervengewebe, bevor es in der Peripherie komplett verschwindet (64).

Das *Perineurium* bildet eine Art Mantel für jeden Faszikel. Es besteht aus der äußeren Pars fibrosa mit mechanischen Eigenschaften und einer inneren Pars epitheloida, die als Fortsetzung der Leptomeningen gilt. Letztere besteht aus mehreren Schichten polygonaler Zellen, die alternierend mit Kollagenfasern zur Perineuralscheide aufgeschichtet sind. Diese Scheide verläuft mit den Faszikeln bis zur letzten peripheren Aufzweigung. Die Pars epitheloida bildet die Zonula occludentes aus und schafft somit eine Diffusionsbarriere zwischen Endoneuralraum und Interstitium (57;90;92).

*Faszikel* sind Bündel einzelner Nervenfasern. Der Faserzwischenraum ist neben Kapillaren, Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen komplett mit *Endoneurium* ausgefüllt. Dieses ist durch eine Basallamina von Glia und Endothelzellen getrennt und sorgt für die Aufrechterhaltung der regionalen Homöostase. Die beschriebene Hierarchie impliziert, dass der Endoneuralraum in kontinuierlichem Kontakt mit dem Liquor cerebrospinalis steht. Die Kapillaren sind vom geschlossenen Typ und bilden eine Blut-Nerven-Schranke (57;90;92).

*Nervenfasern* bestehen aus *Axonen*, die direkt von *Schwannzellen* umgeben sind. Sie bilden die Glia. Je nach Dicke der Glia spricht man von myelinisierten oder von marklosen Fasern, die unterschiedliche Qualitäten führen (57;90;92).



#### 1.4.1 Immunologie des peripheren Nerventraumas

6

Innerhalb von Minuten bis hin zu Stunden nach einem Nervenstrauma aktivieren Calciumströme, die durch den Zellschaden entstanden sind, verschiedene Proteasen, die konsekutiv axonale Membranen andauen (24;33). Dabei anfallende Abbauprodukte stimulieren die Expression von MCP-1 (Monozyten-chemotaktisches-Protein-1) in umliegenden vitalen Schwannzellen über deren membranständige Toll-Like-Rezeptoren, die eine zentrale Position im Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunantwort einnehmen (43;51). Ebenfalls werden von Schwannzellen Nervenwachstumsfaktoren (NGF) und Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 generiert (32;63;76). Es wird vermutet, dass diese Zytokine auch die Expression von Phospholipasen autokrin anstoßen, um die lipidreiche Myelinschicht avitaler Schwannzellen abzubauen. Erst dann können Neutrophile und Monozyten aus dem Blut effektiv in das traumatisierte Gewebe einwandern (69). Die chemotaktische Wirkkomponente von MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 lockt diese Zellen an. Parallel entstehen bei der Myelinolyse Fettsäuren, die über Cyclo- und Lipoxygenasen zu Prostaglandinen und Leukotrienen weiterverwandelt werden. Dies stellt nach etwa 24 Stunden einen zusätzlichen chemotaktischen Faktor für inflammatorische Zellen dar (89). Avitales Gewebe wird schließlich von Phagozyten abgeräumt; verstärkt wird die Phagozytose durch Opsonisierung des avitalen Materials mit Komplementfaktoren (18). Bei der Myelinolyse entsteht aus den Phospholipiden ebenfalls Lipoprotein C, das an das C-reaktive-Protein bindet, wodurch das Komplementsystem aktiviert wird (35).

Neben der initialen Schwannzellaktivität reagieren auch ortständige Gewebsmakrophagen unmittelbar auf das Trauma (68;69). Müller et al. zeigten jedoch, dass diese eher regulierenden Einfluss nehmen, indem sie an der Chemotaxis beteiligt sind und Antigene über ihre MHC-II-Oberflächenproteine präsentieren (68;69). Eingewanderte hämatogene Makrophagen (bzw. umgewandelte Monozyten) übernehmen eine deutlich stärkere Effektorrolle bezüglich des Gewebeabbaus (68;69). Außerdem sezernieren Makrophagen Prostaglandine, TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6, exprimieren NO-Synthase und bilden reaktive Sauerstoffspezies (63). Makrophagen sind somit auch auf der humoralen und chemisch-toxischen Ebene involviert.

Auch Mastzellen werden durch Nervenfaserschäden aktiviert. Der Mechanismus ist nicht bekannt (62;63;77). Degranuliertes Histamin rekrutiert jedoch ebenfalls

inflammatorische Zellen (31;62;63). Andere sezernierte Substanzen sind Serotonin, Prostaglandine, verschiedene Chemokine (63).

Vom erworbenen Immunsystem sind neben T<sub>C</sub>- und natürlichen Killerzellen vor allem T<sub>H</sub>-Zellen beteiligt. Als CD4<sup>+</sup>-Zelltyp werden sie von antigenpräsentierenden Zellen über MHC-II-Moleküle aktiviert (63;67). Der Subtyp T<sub>H</sub>1 produziert hauptsächlich die proinflammatorischen Cytokine IL-2 und INF- $\gamma$  zur Optimierung der immunologischen Antwort (63;67). T<sub>H</sub>2-Zellen gelten als T<sub>H</sub>1-Gegenspieler und sezernieren antiinflammatorische Cytokine (IL-4,5,6,9,10,13) (63;67). Die Rolle der B-Zell-Population ist im Zusammenhang mit Nervenstraumata unbekannt (63).

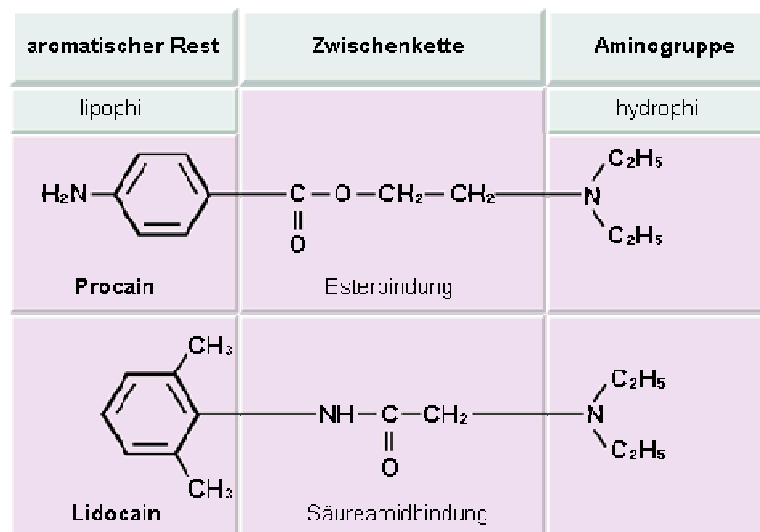
Das Ende der Immunreaktion wird durch antiinflammatorische Cytokine, besonders IL-10, eingeleitet, das von T<sub>H</sub>2-Zellen und Makrophagen produziert wird, nachdem diese Myelin phagozytiert haben (16). Mittels Expression verschiedener Rezeptoren, können inflammatorische Zellen das Gewebe wieder verlassen, bevor vitale Zellen reparativ proliferieren. Andernfalls käme es zu einer sich selbst erhaltenden Inflammation. Diese Emmigrationsmechanismen werden bisher nur unzureichend verstanden (61).

Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass NO, reaktive Sauerstoffspezies, Serotonin, Prostaglandine, TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 Schmerzrezeptoren aktivieren. Symptomatisch äußert sich dies als Neuropathie (63). Eine genauere Zuordnung immunologischer Mechanismen zu neurologischen Defiziten ist bisher nicht möglich. Dennoch wird eine intraneurale Akkumulation inflammatorischer Zellen 48 Stunden nach einem Schadensereignis als ein verlässlicher Marker für traumaassoziierte Neuropathie angesehen (53;68;69). Eine derartige Neuroinflammation kann durch intraneurale Injektion ausgelöst werden (36;42;58;79). Ebenso können degenerative Veränderungen der Myelinscheide beobachtet werden (36;42;79;93).

#### **1.4.2 Pharmakologie und Toxikologie von Lokalanästhetika**

Pharmakologisch gesehen sind Lokalanästhetika amphiphile Moleküle mit lipophilen aromatischen Seitenketten und basischen terziären Stickstoffatomen (4). Die beiden Strukturen sind ester- oder amidartig miteinander verbunden [s. Abb. 3]. Mit pK<sub>a</sub>-Werten zwischen 7,8 und 9 werden Lokalanästhetika in wässriger Lösung mit pH-Werten unter 6 injiziert. Bei normalem Gewebe-pH um 7,4 sind sie im Mittel zu 70% positiv geladen und dadurch nur mäßig gewebebegängig, um an ihren Wirkort zu

gelangen (4;47;50;66). Jedoch sind sie nur im geladenen Zustand pharmakodynamisch aktiv (4;47;50;66).



**Abbildung 3** Molekulare Grundstruktur der beiden pharmakologischen Hauptgruppen der Lokalanästhetika am Bsp. Procain und Lidocain

[aus: Roche Lexikon Medizin, 5. Aufl. Urban & Fischer, 2003]

Ab einer spezifischen kritischen Konzentration aggregieren Lokalanästhetika zu Mizellen (45). Ähnlich der Phagozytose können Mizellen mit Zellmembranen fusionieren und Teile von ihnen in ihrem lipophilen Kern einkapseln - Lokalanästhetika verhalten sich somit wie Detergenzien (6;37). In vitro-Untersuchungen zeigen, dass die Bildung detergenten Molekülkomplexe aus Lokalanästhetika Zellmembranen aufbrechen können (6;37). Unter der Annahme, dass der wässrige Anteil einer Lokalanästhetika-Lösung vom neuralen Hüllgewebe resorbiert wird, könnte die Konzentration der Wirksubstanz ansteigen und Nervenfasern zersetzen (45). Lirk et al. berichten darüber hinaus, dass die in der klinischen Routine genutzten Substanzen Bupivacain und Ropivacain apoptoseinduzierende Enzyme aktivieren (p38, MAP-Kinase, JN-Kinase u.a.) (54;55). Außerdem sollen nach Bupivacaingabe laut Park und Kollegen reaktive Sauerstoffspezies an der Apoptoseinduktion speziell in Myelinscheiden und Neuronen des peripheren Nervensystems beteiligt sein (71). In vivo konnte bisher keiner dieser Mechanismen bestätigt werden. Es wird allgemein akzeptiert, dass toxische Effekte der Lokalanästhetika mit Konzentrationszunahme und Anwendungsdauer über 24 Stunden vermehrt auftreten (39;78;94;95). In hohen

Injektionsdosen können sie irreversible neurale Schäden auslösen (39;49). Von den klinisch routinemäßig angewendeten Substanzen gelten Bupivacain, wie in der vorliegenden Studie verwendet, und Ropivacain als am stärksten toxisch im Vergleich zu Prilocain, Mepivacain u.a. Lokalanästhetika (93-95).

## 1.5 Klinische Grundlagen

### 1.5.1 *Durchführung peripherer Nervenblockaden*

Die Blockade eines peripheren Nerven beginnt mit dem Aufsuchen der Zielstruktur. Hierzu gibt es zwei grundsätzliche Möglichkeiten: elektrische Nervenstimulation und Ultraschalltechnik. Beide Verfahren beabsichtigen, die Punktionskanüle ausreichend nahe an der Zielstruktur zu platzieren.

Bei der Stimulationstechnik wird die Haut mittels einer Stimulationskanüle punktiert und gleichzeitig der in der Tiefe liegende Nerv mit periodischen Stromimpulsen weniger Milliampère gerade so gereizt, dass eine konsekutive Kontraktion des Kennmuskels beobachtet werden kann (25;50). Dadurch erlaubt diese Methode den Rückschluss, ob tatsächlich der gewünschte Nerv erregt wird (25;50). Umso näher die Nadelspitze dem Nerven kommt, desto kleiner kann die Stromstärke gewählt werden, um die Muskelkontraktion auszulösen. Im Bereich 0,2-0,5 mA liegt die Nadelspitze nach gängiger klinischer Praxis nahe genug am Nerv, ohne diesen zu berühren (25). Neuere tierexperimentelle Untersuchungen geben jedoch Werte von bis zu 1,4 mA an, bei denen der Nadel-Nerv-Abstand ausreichend klein zu sein scheint, um Nerven regelhaft erfolgreich zu blockieren (85). Nach negativer Testaspiration kann nun ein Lokalanästhetikum appliziert werden.

Die Sonographie stellt im Gegensatz zur Elektrostimulation die anatomischen Verhältnisse im Blockadegebiet, das Vorschieben der Nadel und die Applikation des Lokalanästhetikums bildlich und in Echtzeit dar (11;13;59;60). Werden gute Kenntnisse der anatomischen Topographie vorausgesetzt, können sich Elektrostimulation und sonographische Darstellung als sog. Dual-Guidance sinnvoll ergänzen (91).

Ob die Ultraschall- im Vergleich zur Stimulationstechnik Komplikationen besser vermeiden kann, ist der Studienlage nicht eindeutig entnehmen. Eine Metaanalyse von



2008 zeigt keinen signifikanten Unterschied beider Verfahren (48), ebenso eine Untersuchung aus 2009 (3). Einige Autoren ermittelten unter Einsatz der Sonographie eine höhere Erfolgsrate und schnellere Durchführbarkeit (20;22;48;60;83). Außerdem soll aufgrund der exakten Nadelplatzierbarkeit eine geringere Menge an Wirksubstanz für eine erfolgreiche Nervenblockade ausreichend sein (48). Bezüglich der vorliegenden Untersuchung kann laut Bigeleisen et al. eine intraneurale Injektion mittels Ultraschall ausreichend gut erkannt werden (11). Darüber hinaus berichten Vassiliou und Kollegen, dass mit dem Dual-Guidance-Verfahren, im Vergleich zur Anwendung nur eines der beiden Verfahren, die Inzidenz intraneuraler Injektionen und perineuraler Hämatombildung reduziert werden kann (91).

### **1.5.2 *Komplikationen peripherer Nervenblockaden***

Das Komplikationsspektrum von Leitungsanästhesien umfasst akzidentielle Verletzungen des Zielgewebes (Plexus, einzelne Nerven) und angrenzender Strukturen (Punktion von Gefäßen, parenchymatösen Organen, des Subarachnoidalraums) (15;47;50). Dadurch können neurologische und systemische Komplikationen ausgelöst werden. Zu den systemischen zählen bspw. Herzrhythmusstörungen und Herzstillstand (0,01%), Krampfanfälle (0,08%) oder Tod (0,005%) nach unbemerkter Gefäßpunktion mit anschließender intravasaler Injektion des Lokalanästhetikums (7). Neurologische Beschwerden äußern sich als motorische oder sensible Defizite oder als Kombination dieser beiden Funktionsstörungen. In der Literatur wird hierbei zwischen reversiblen (3%-50%) und irreversiblen (0,04%-1%) Defiziten unterschieden (7;8;15;21;29;81). Sämtliche Beschwerdebilder können vorübergehend oder chronisch auftreten. Der neuropathologische Befund kann daher nicht als Prädiktor für den zeitlichen Verlauf der Symptome herangezogen werden (8;14;21;29). Die Inzidenz der Nervenschäden ist laut mehreren Autoren auch von der Anlage der Blockade im Nervenverlauf abhängig (64;73;75). Der Anteil an Axonen gegenüber dem Hüllgewebe nimmt nach distal kontinuierlich zu, wodurch die Irritation der Nervenfasern wahrscheinlicher wird. Im peripheren Nerv ist der Nervengewebsanteil schließlich größer als 80% (64;73;75). Distale Blockadeverfahren sollen daher ein höheres Risiko für Nervenschäden haben als proximale, sofern das Nervengewebe akzidentuell penetriert wurde (64;73;75).

Aus methodischer Sicht gibt es mehrere Gründe für die abweichenden Schadenshäufigkeiten: Manche Studien fassen - gegenüber höherqualitativeren prospektiven Untersuchungen (7;15) - retrospektiv Daten zusammen (7;10;21;23). Daten stammen z. T. aus freiwilligen Angaben der jeweiligen Studienzentren (7) und die Definitionen der Symptome und somit der Ein- und Ausschlusskriterien variieren (7;10;15;21;23). Außerdem sind Nachuntersuchungszeiträume unterschiedlich gewählt (7;10;15;21;23). Da Symptome auch erst mit einer Latenz von bis zu 48 Stunden auftreten können, besteht die Gefahr, dass ein kausaler Zusammenhang unterschätzt wird (8). Die Vergleichbarkeit der evaluierten Komplikationsraten ist daher nur eingeschränkt gegeben. Dennoch treten in der Gesamtschau neurologische und systemische Komplikationen nach peripherer Leitungsanästhesie mit eher geringer Häufigkeit auf (21). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen neurologischen Symptomen und Nervenblockadeverfahren herzustellen, sollten zudem andere perioperative Ätiologien ausgeschlossen werden. Diese sind: Vorbestehende neuropsychiatrische Erkrankungen, chirurgisches Trauma, Trauma durch intraoperative Fehllagerung bzw. Druckschäden, Überhangwirkung der Lokalanästhetika und postoperative allgemeine Entzündungszeichen im Wundbereich (47;50). Bezogen auf die einzelnen Schritte eines Nervenblockadeverfahrens lassen sich Nervenläsionen nach ihren denkbaren Entstehungsmechanismen in Anlehnung an Selander et al. und Sorenson et al. in drei wesentliche Gruppen unterteilen (79;84):

- ***Trauma durch Punktion***

Der direkte Nadel-Nerv-Kontakt kann zu einer Traumatisierung von Nervengewebe führen. Im Rahmen der Wundheilung kommt es zur Reorganisation des Bindegewebes mit Narbenbildung (80;86;87).

- ***Trauma durch Nerventraktion, Nervenkompression, Intraneurale Injektion***

Im Mittelpunkt steht hier ein mechanisch bedingtes Trauma, das sekundär eine anhaltende lokale Ischämie des Nerven verursachen kann (11;42). Ein solches Trauma könnte ausgelöst werden durch Zug- und Scherkräfte bei Nervendehnung, durch Druck von außen bei Fehllagerung bzw. direkter Nervenkompression oder durch Druck von innen bei intraneuraler Injektion

(36;47;50;58;79;93). Letzteres ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Außerdem könnte eine akzidentielle perineurale Gefäßperforation zur Hämatombildung innerhalb der Gefäß-Nerven-Scheide führen und sukzessiv Nerven komprimieren. Vermutlich wird durch das Barotrauma auch die Blut-Nerven-Schranke geschädigt (79). Daraus folgen Permeabilitätsstörung und Ödembildung, die zu einer andauernden Druckerhöhung und Ischämie auf perineuroner Ebene beitragen (13;42).

- **Neurotoxische Wirkung der injizierten Substanz**

Lokalanästhetika sind in Abhängigkeit ihrer Konzentration und der Einwirkzeit neurotoxisch (39;49;78;94;95). Inwiefern dieser Traumamechanismus zum Tragen kommt, wird in der vorliegenden Untersuchung mitevaluiert.

## 1.6 Studienlage

Die Frage, inwiefern die Integrität von Nervengewebe durch direkte Injektion von Lokalanästhetika gestört wird, wird bereits seit ca. 50 Jahren wissenschaftlich evaluiert. Erste systematische Untersuchungen dazu publizierten Selander et al. in den 1970er Jahren (79). Sie konnten an frei präparierten Ischiadikusnerven von Albinohasen zeigen, dass eine perineurale Applikation von Bupivacain keine histologischen Veränderungen hervorruft (79). Nach intraneuraler Injektion trat eine axonale Degeneration auf, die mit Dosiszunahme und der Beigabe von Adrenalin aggravierte (79). Selander empfahl folglich die strikte Vermeidung intraneuraler Injektionen (79). Des Weiteren solle auf katecholaminerge Adjuvantien verzichtet werden, da die gefundenen histologischen Veränderungen neurologische Beschwerden verursachen könnten (79).

Ausgehend von Selander et al. wurden in den vergangenen 10 Jahren von mehreren Arbeitsgruppen histologische Nervenschäden in Folge von Nervenblockadeverfahren weitergehend untersucht (11;36;58;79;93). 2004 examinierten Hadzic et al. Ischiadikusnerven von Hunden nach intraneuraler Applikation von Lidocain (36). Anhand einer Injektionsdruckmessung wurde die intraneurale Nadellage von einer perineuralen abgegrenzt (36). Die Tiere wurden im Verlauf zunächst für 7 Tage auf neurologische Defizite untersucht, bevor sie zur histologischen Analyse euthanasiert

wurden (36). Die neurologischen Befunde wurden mit den histologischen Ergebnissen korreliert (36). Dabei traten in jenen Nerven schwere histologische Schäden auf, in die mit hohem Druck injiziert wurde (36). Die betroffenen Tiere zeigten schwere motorische Beeinträchtigungen (36). Hadzic et al. schlussfolgerten, dass durch Injektionsdruckmessung hohe Injektionsdrücke vermieden werden könnten (36). Somit würde das Risiko für schwere Nervenschäden und anschließende neurologische Beschwerden sinken (36). Jedoch geht nicht jede intraneurale Injektion mit einem hohen Injektionsdruck einher (36). Dies könnte laut Autor daran liegen, dass im intraneuralen Raum zusätzlich zwischen einer intrafaszikulären Injektion und einer Injektion in das Nervenstroma unterschieden werden müsse (36). Möglicherweise führen nur intrafaszikuläre Injektionen zu relevanten Nervenschäden (36).

2010 untersuchten Lupu und Kollegen histopathologische Veränderungen an porcinen Medianusnerven nach intraneuraler Injektion (58). Ähnlich des Studienprotokolls von Hadzic wurden Injektionsdrücke gemessen, zusätzlich die Verteilung des Lokalanästhetikums via Ultraschall beurteilt (36;58). Bevor die Tiere für die histologische Analyse euthanasiert wurden, wurden sie 7 Tage auf neurologische Defizite nachbeobachtet (58). Lupu et al. fanden keinen Zusammenhang zwischen der sonographisch beobachteten Nervenausdehnung und der histopathologisch evaluierten Neuroinflammation (58). Die von Hadzic et al. festgestellte Korrelation von Injektionsdruck und histologischer Veränderung konnte hier nicht bestätigt werden (36;58). Außerdem wies keines der Tiere im gesamten Beobachtungszeitraum neurologische Defizite auf (58).

Whitlock et al. veröffentlichten ebenfalls 2010 eine Untersuchung zum neurotoxischen Verhalten von Ropivacain an Ischiadikusnerven im Nagermodell (93). Hierzu wurde in der histologischen Auswertung neben einer Neuroinflammation der Grad der Demyelinisierung ermittelt (93). Außerdem wurde zwischen einer extraneuralen, einer intraneuralen aber extrafaszikulären und einer intrafaszikulären Injektion unterschieden (93). Whitlock und Kollegen stellten fest, dass bei intrafaszikulärer Injektion Nervenschäden am ausgeprägtesten auftraten (93).

Zusammenfassend zeigt sich, dass bisherige Untersuchungen nicht eindeutig genug klären konnten, inwiefern die beabsichtigte Injektion von Lokalanästhetika in

Nervengewebe zu einer Nervenschädigung führt (11;36;58;79;93). Es scheint jedoch eine Vielzahl von Einflussfaktoren zu geben, die am Ende dieser Dissertation ausführlich diskutiert werden. Vorerst lässt sich sagen, dass die Qualität der gegenwärtigen klinischen sowie experimentellen Methoden (Stimulation, Ultraschall, Injektionsdruckmessung) nicht ausreicht, um eine intraneurale Injektion gänzlich auszuschließen bzw. eine mögliche Schädigung durch intraneurale Injektion mit Sicherheit vorhersagen zu können (58). Weiterhin ist das Schadensausmaß nach kurzen Latenzintervallen zur Intervention bisher nicht untersucht worden, obwohl der Höhepunkt der inflammatorischen Reaktion schon nach 48 Stunden zu erwarten ist (53;68;69). Ein möglicher Zusammenhang zeitnah zur Intervention wurde somit u. U. nicht erfasst. Zur Schadensevaluation würde sich ein reproduzierbarer Score eignen, der alle wesentlichen Schadensentitäten beinhaltet (Inflammation, Hämatome, Myelinschädigung) und jene durch geeignete Färbemethoden separat beschreibt. Einen derartigen Score haben Steinfeldt et al. entwickelt (86;87). Myelinschäden werden dabei durch eine zusätzliche Färbemethode evaluiert (86;87).

### **1.7 Fragestellung**

Die in der Studienlage zusammengefassten Aspekte wurden in der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt. Dazu wurden intraneurale Injektionen an porcinen brachialen Extremitätennerven in situ durchgeführt. Verglichen wurden die Wirkungen von Bupivacain 0,5% und Ringerlösung. Die biologische Reaktionszeit wurde nach 48 Stunden durch Euthanasie der Versuchstiere beendet. Zur histologischen Auswertung wurde ein fünfgradiger Score angelegt, der Invasion inflammatorischer Zellen, intraneurale Hämatome und Myelinschäden in drei verschiedenen Färbungen beurteilt. Die Studie wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob 48 Stunden nach intraneuraler Injektion schwere Nervenschäden im Sinne einer Demyelinisierung auftreten und dabei ein Unterschied zwischen einer elektrolythaltigen Lösung und einem klinisch üblichen Lokalanästhetikum besteht. Primärer Endpunkt der Untersuchung war die histologische Evaluation anhand eines ordinalskalierten Trauma-Scores.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

#### 2.1.1 *Das Schwein als Modell*

Das porcine Modell eignet sich in Bezug auf die Fragestellung dieser Studie besser als andere Versuchstiere wie Ratten, Mäuse oder Kaninchen, da die neuromuskuläre Anatomie und Immunologie in weiten Teilen mit dem Menschen vergleichbar ist (88). Die nötige Nervenexzision für die histologische Untersuchung am Menschen vorzunehmen, wäre ethisch nicht vertretbar. Die Durchführung der Versuche erfolgte gemäß den Helsinki Konventionen <sup>1</sup> und mit der Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen<sup>2</sup>.

#### 2.1.2 *Art und Haltung der Versuchstiere*

Es wurden sieben Mastschweine der Rasse Deutsches Landschwein (*Sus scrofa domesticus*) als Versuchstiere verwendet. Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Schweine in die Tierversuchsanlage der Universität Marburg gebracht, wo sie während der Eingewöhnungsphase zu zweit in Boxen im Inneren der Anlage gehalten wurden. Standardisiertes Ferkelfutter (Typ Raiffeisen Hessen) wurde den Tieren bis 14 Stunden sowie Wasser in Bedarfsbehältern bis zum Abend vor OP-Beginn angeboten.

#### 2.1.3 *Ein- / Ausschlusskriterien*

Es wurden ausschließlich die Versuchstiere in die Studie eingeschlossen, die äußerlich einen gesunden Eindruck vermittelten und in der tiermedizinischen Untersuchung einen unauffälligen Befund vorwiesen. Wegen der günstigeren Anatomie der ableitenden Harnwege bezüglich der geplanten suprapubischen Dauerkatheterisierung, wurden ausschließlich weibliche Tiere genutzt. Eingeschlossen wurden Tiere im Gewichtsbereich 25-40 kg und im Altersbereich 5-7 Monate.

---

<sup>1</sup> Helsinki conventions for the use and care of animals

<sup>2</sup> Aktenzeichen: 20-15(1)MR20/13-Nr. 54/2009

## 2.2 Die verwendeten Injektionslösungen

### RINGERLÖSUNG

<b>Name und Hersteller:</b>	Ringerlösung B. Braun Infusionslösung® B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland
<b>Zusammensetzung:</b>	Na <sup>+</sup> : 147 mmol/L; K <sup>+</sup> : 4 mmol/L; Ca <sup>2+</sup> : 2,2 mmol/L; Cl <sup>-</sup> : 156 mmol/L
<b>Anwendung:</b>	Vollelektrolytlösung ohne verstoffwechselbare Anionen zur kristallinen Volumensubstitution. Zur Auflösung und Verdünnung von Medikamenten geeignet. Entwicklung um 1900.

### BUPIVACAIN

<b>Name und Hersteller:</b>	Carbostesin 0,5%® hyperbar B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland
<b>Wirkstoff:</b>	chirales Lokalanästhetikum vom Amid-Typ. pK <sub>a</sub> =8,1; im Blut zu 95% proteingebunden; hohe analgetische Potenz; langsamer Wirkeintritt; Wirkdauer 4-5 Stunden; HWZ 3 Stunden; hepatische Elimination
<b>Anwendung:</b>	Zur Hautinfiltration, periduralen oder spinalen Anästhesie und peripheren Nervenblockade geeignet. Einführung 1966.

## 2.3 Versuchsdurchführung

### **2.3.1 Anästhesieeinleitung**

Das Experiment wurde unter allgemeinanästhesiologischen Bedingungen durchgeführt. 30 Minuten vor Narkoseeinleitung wurden 2 mg/kg Diazepam (Diazepam-ratiopharm®)<sup>3</sup> und 20 mg/kg Ketamin (Ketavet®)<sup>4</sup> zur Prämedikation intramuskulär appliziert. Nach Legen einer 20G-Venenverweilkanüle (Vasofix® Braunüle®)<sup>5</sup> in eine gut darstellbare Ohrvene erfolgte die Einleitung der Allgemeinanästhesie durch

<sup>3</sup> ratiopharm GmbH, 89079 Ulm, Deutschland

<sup>4</sup> Pfizer, 76139 Karlsruhe, Deutschland

<sup>5</sup> B.Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland

intravenöse Gabe von 1-2 µg/kg Sufentanil (Sufenta®)<sup>6</sup> und 2-3 mg/kg Propofol (Propofol 2% MCT®)<sup>7</sup>. Daraufhin konnte in Bauchlage die Endotrachealintubation mit einem Tubus mit Cuff der Größe 5,5 mm Innendurchmesser (Rüschelit®)<sup>8</sup> durchgeführt werden. Nach Verifikation der Tubuslage wurden die Tiere maschinell beatmet (PCV). Muskelrelaxantien wurden zur Anästhesieeinleitung nicht verwendet.

Wegen der Beatmungszeit von mehr als 24 Stunden wurden zur Durchführung einer suffizienten Bronchialtoilette die Versuchstiere nach der Einleitung tracheotomiert. Dazu wurde die Trachea zwei Knorpelspangen unterhalb des Ringknorpels chirurgisch dargestellt und eröffnet. Ein gekürzter Endotrachealtubus mit Cuff eines Innendurchmessers von 7,0 mm (Rüschelit®)<sup>8</sup> wurde unter langsamer Retraktion des transoralen Tubus eingelegt, geblockt und doppelt nahtfixiert. Ein zentraler, dreilumiger Venenkatheter der Größe 7 Charr. x 30 cm (Mehrlumiger Polyurethran Venenverweilkatheter mit Blue Flex Tip®)<sup>9</sup> wurde ebenfalls nach chirurgischer Freilegung der Vena jugularis interna platziert, um eine adäquate Volumentherapie vornehmen zu können. Es wurde unter aseptischen Bedingungen operiert. Die Narkose wurde bis Operationsende kontinuierlich mit 1 µg/kg/h Sufentanil<sup>6</sup> und 2 mg/kg/h Propofol<sup>7</sup> unter druckkontrollierter Beatmung (Servo ventilator 300 bzw. 900 C®)<sup>10</sup> fortgeführt.

---

<sup>6</sup> Janssen-Cilag GmbH, 41470 Neuss, Deutschland

<sup>7</sup> Fresenius Kabi GmbH, 61352 Bad Homburg v. d. H., Deutschland

<sup>8</sup> Rüsch Medical GmbH, 71394 Kernen i. R., Deutschland

<sup>9</sup> Arrow Deutschland GmbH, 85435 Erding, Deutschland

<sup>10</sup> Siemens AG, 80333 München, Deutschland



### 2.3.2 Versuchsgruppen

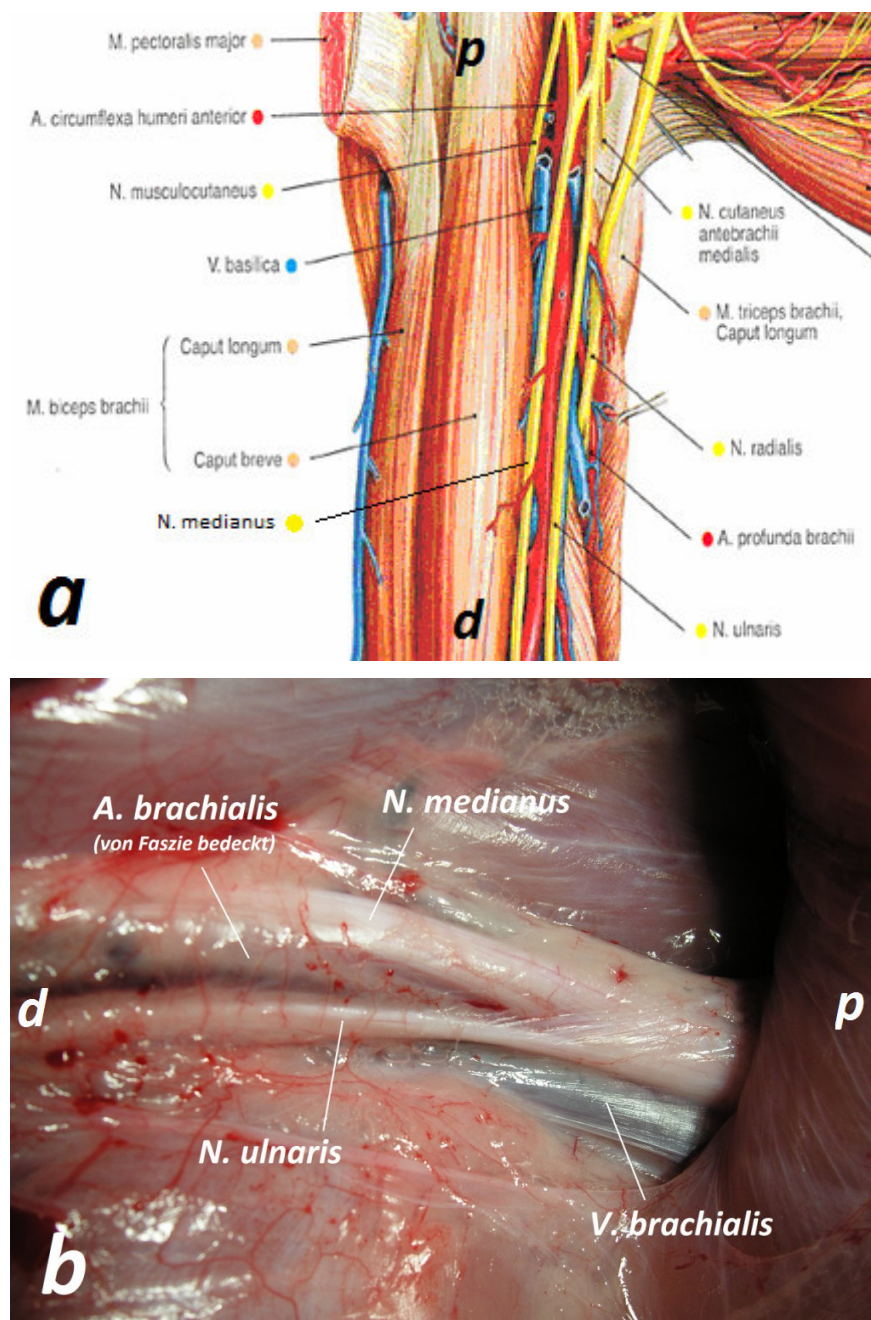
<i>Interventionsnerven</i>	<i>Art der Intervention</i>	<i>Anzahl</i>
<b>Gruppe R</b> brachiale Nerven	Trauma durch intraneurale Injektion mit Ringerlösung	20
<b>Gruppe B</b> brachiale Nerven	Trauma durch intraneurale Injektion mit Bupivacain	20

<i>Kontrollnerven</i>	<i>Art der Intervention</i>	<i>Anzahl</i>
<b>Negativkontrolle</b> Nervus tibialis links	Kontrolle systemischer Confounder (Infektion, Antibiose, Narkotika); keine Intervention; „Nullnerv“	7
<b>Positivkontrolle</b> Nervus tibialis rechts	Kontrolle des verwendeten Scores als definitive mechanische Schädigung durch Ligatur; „Maximaltrauma“	7

### 2.3.3 Präparation der Nerven

Für die Intervention wurden die axillären Abschnitte der peripheren Extremitätennerven präpariert. Dazu wurden die Schweine in Rückenlage gebracht und die oberen Extremitäten in leichter Abduktionsstellung fixiert, um das somit zugängliche Operationsfeld chirurgisch zu desinfizieren und steril abzudecken. Unter aseptischen Bedingungen wurden die Axillarregionen beidseits durch etwa 15 cm lange Inzisionen entlang der vorderen Axillarlinie eröffnet. Haut- und Muskelschichten wurden mit Vorsicht präpariert, die kreuzende Vena cephalica bei Bedarf ligiert und durchtrennt. Zur optimalen Darstellung der Zielstrukturen wurden Teile des am kranialen Rand verlaufenden Musculus pectoralis major reseziert. In der Tiefe liegende Bindegewebefasien wurden mit stumpfem Instrument oder manuell beseitigt, um akzidentielle Nerventraumata zu vermeiden. In situ lag eine typische Topographie der axillären Gefäßnervenstraße vor, anhand derer die Zielnerven bei allen Versuchstieren eindeutig identifiziert werden konnten. Diese sind: Nervus medianus, ulnaris, radialis [s. Abb. 4]

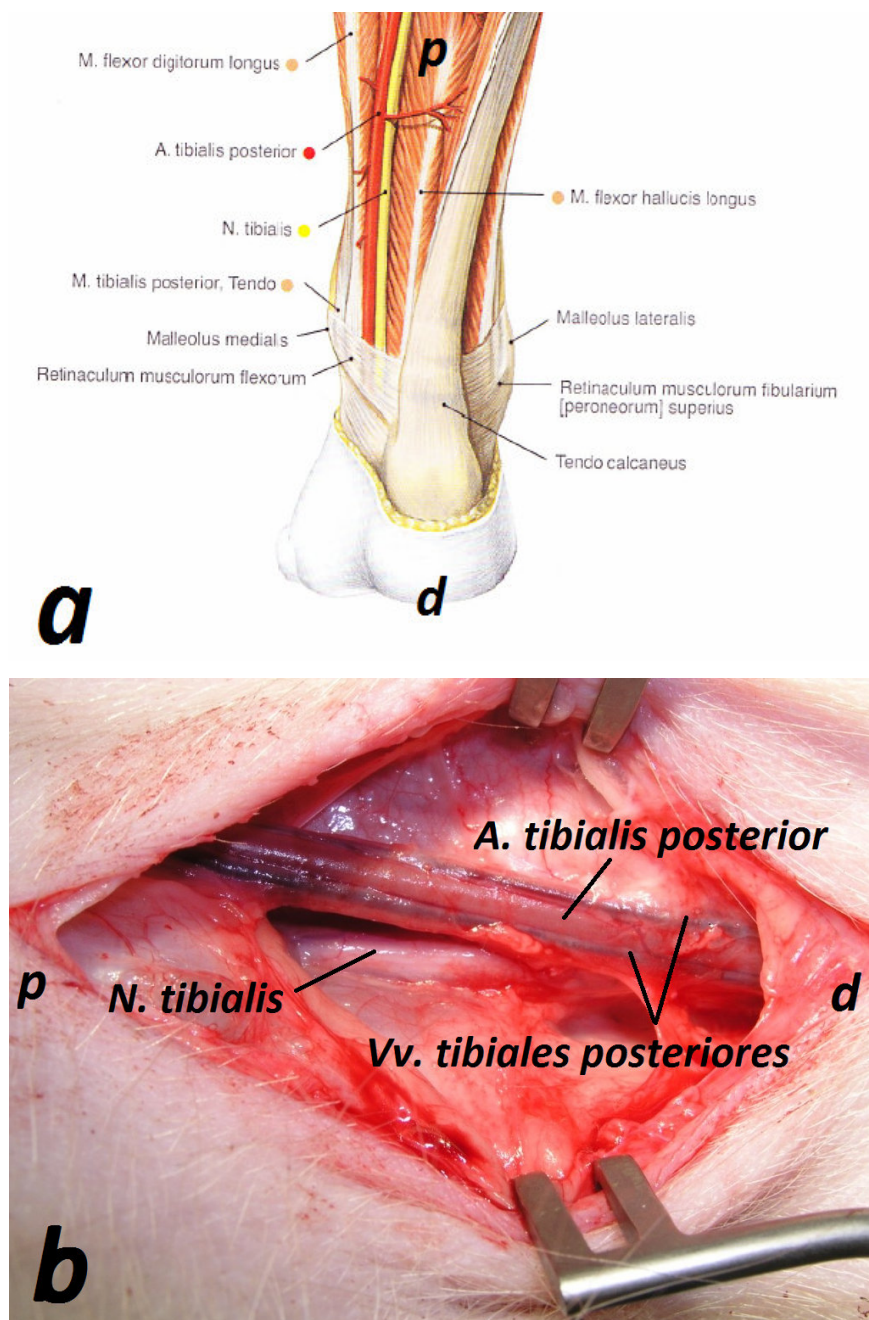
Am rechten Hinterlauf wurde vergleichbar vorgegangen, um den Nervus tibialis darzustellen. Dieser verläuft am Unterschenkel in aller Regel unmittelbar hinter der Arteria tibialis posterior [s. Abb. 5], die als Leitstruktur zunächst sorgfältig freipräpariert wurde. Der Zielnerv wurde vor Anlage der Ligaturen durch Elektrostimulation eindeutig identifiziert.



**Abbildung 4** Regio axillaris

*p, proximal ; d, distal*

- a)** anatomische Zeichnung des humanen Plexus brachialis rechts, vertikaler Nervenverlauf [modifiziert nach R. Putz, Sobotta – Atlas der Anatomie, 22. Aufl. Urban & Fischer, 2006]
- b)** porciner OP-Situs Axilla rechts, horizontaler Nervenverlauf; N. radialis in der Tiefe, hier nicht sichtbar



**Abbildung 5** Regio cruris posterior

*p, proximal ; d, distal*

**a)** anatomische Zeichnung des humanen Unterschenkels rechts, vertikaler Nervenverlauf [modifiziert nach R. Putz, Sobotta – Atlas der Anatomie, 22. Aufl. Urban & Fischer, 2006]

**b)** porciner OP- Situs der tibialen Gefäß-Nerven-Straße rechts

### 2.3.4 Axilläre und tibiale Interventionen

**Intraneurale Injektion:** Die intraneurale Injektion erfolgte an freiliegenden Nerven im Axillarbereich. Pro Axilla wurden insgesamt drei Injektionen mit der gleichen Substanz

vorgenommen (bei einem Tier nur 2). Rechtsseitig Ringerlösung, linksseitig Bupivacain. Zur Injektion wurde eine Facettennadel mit einem Durchmesser von 24 G und einer Länge von 25 mm verwendet. Die Injektionsnadel wurde in einem Winkel von 30° bis 45° an den jeweiligen Nerv angesetzt und nach Penetration der äußeren Bindegewebsfaszie (Widerstandsverlust) langsam für 0,5 cm möglichst parallel zum Faserverlauf nach proximal vorgeschoben. Unter direkter Sichtkontrolle wurde die jeweilige Substanz injiziert. Dabei wurde strikt zwischen korrekter und inkorrekt intraneuraler Nadellage unterschieden:

- ***Kriterium für korrekte intraneurale Lage***

Zirkuläres Aufblähen der Nerven entlang der Injektionsrichtung bei gleichzeitiger Entfärbung des typisch graugelben Nerven kolorits; das Nervengewebe erschien ischämisch weiß; Verteilung des Injektats auf einer Distanz von 2-3 cm in proximaler Richtung.

- ***Kriterium für inkorrekte intraneurale Lage***

Ausbildung eines subepineuralen, klaren, ödemartigen Sacks. Keine Entfärbungszeichen.

Im Fall der inkorrekten Lage wurde die Injektion gestoppt, die Nadelposition korrigiert, die Injektion fortgesetzt. Dieses Procedere wurde so oft wiederholt, bis die Kriterien für eine korrekte intraneurale Lage beobachtet wurden. Pro Nerv wurden exakt 2 ml Injektat intraneural platziert. Subepineural appliziertes Volumen ist davon ausgenommen. Eine Unterscheidung zwischen intrafaszikulärer und extrafaszikulärer Injektion wurde nicht getroffen. Die Punktionen wurden auf einer orthogonalen Linie zum Nervenverlauf gesetzt. Zur Re-Identifikation der oberflächlichen Einstichstellen wurde im kranialen und kaudalen Muskelgewebe je eine luftgeknötete Ligatur gesetzt. Zusätzlich erfolgte eine photographische Dokumentation der Zielstrukturen [s. Abb. 6]. Danach wurden die Axillae mit einer mehrschichtigen Wundnaht verschlossen und einem sterilen Verband abgedeckt.



**Maximaltrauma:** Zur Durchführung eines maximalen Schadens wurde der rechte Nervus tibialis freigelegt. Nach Identifikation des Zielnervs wurde dieser zweimal im Abstand von ca. 2 cm stramm ligiert, wodurch eine starke mechanische Schädigung hervorgerufen werden sollte [s. Abb. 7]. Der ca. 5 cm lange Hautschnitt wurde genäht und mit einem sterilen Verband versorgt.

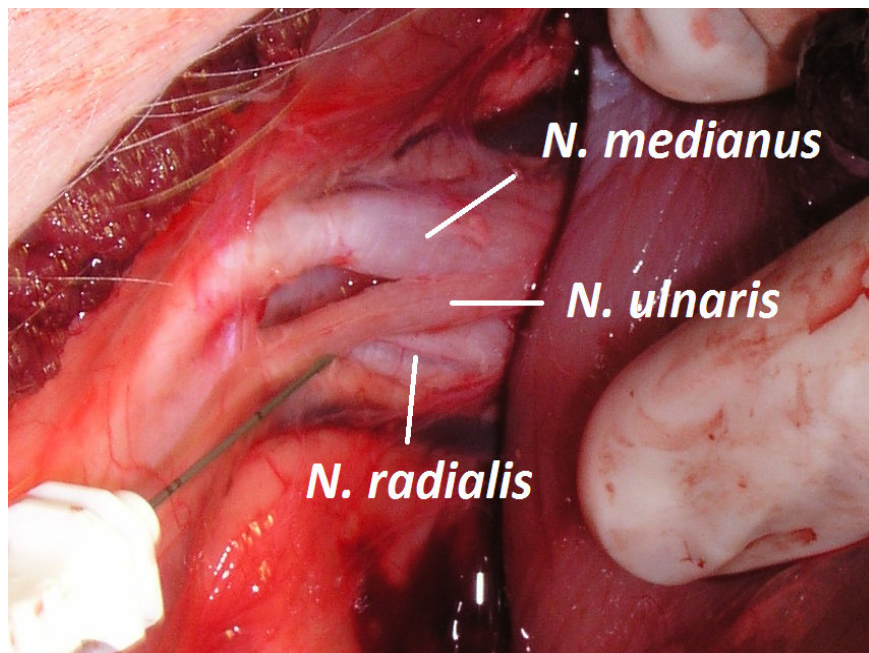


Abbildung 6 Axilläre Nerven nach bzw. während der Injektion

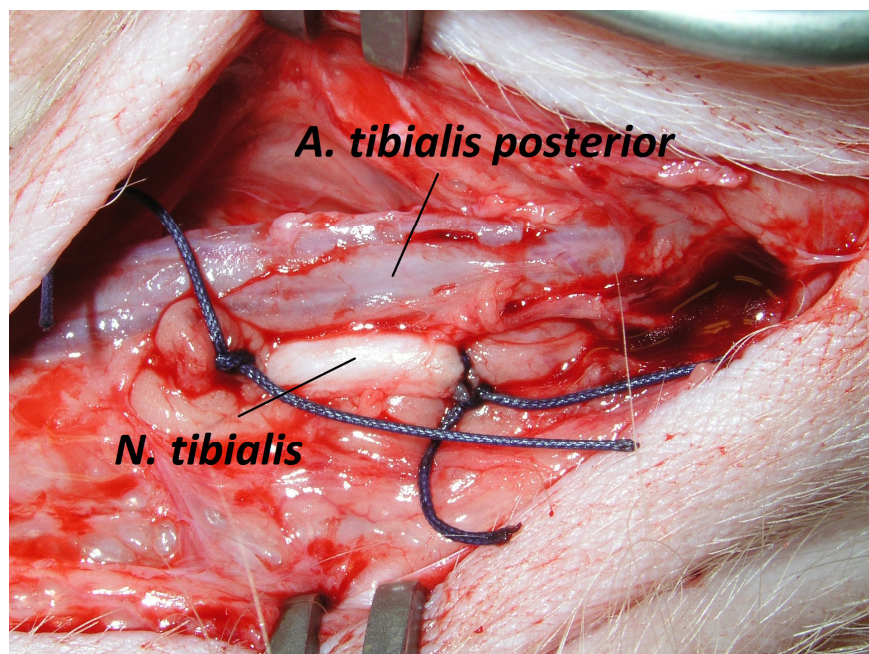


Abbildung 7 Maximal traumatisierter N. tibialis durch zweiseitige Ligatur

### **2.3.5 Anästhesie**

Zur geregelten Harnableitung und Bilanzierung des Flüssigkeitshaushalts wurde ein suprapubischer Dauerkatheter der Größe 10 Charr (Cystofix®)<sup>5</sup> angelegt. Die Tiere wurden im druckkontrollierten Beatmungsmodus normoventiliert (etCO<sub>2</sub>: 35-45 mmHg). Sechstündlich wurde zwischen linker und rechter Seitenlage gewechselt und die Lungen mittels Lachmann-Manöver zur Entfaltung von Atelektasen gebläht. Die Beatmungsparameter orientierten sich an den erhobenen Messwerten (SpO<sub>2</sub>, etCO<sub>2</sub>, AMV, PAW) und der individuellen Physiologie der Tiere. Intensivmedizinische Betreuung und Überwachung wurde stündlich dokumentiert (EKG, SpO<sub>2</sub>, etCO<sub>2</sub>, Temperatur, Bilanzierung, Lagerung, Gabe weiterer erforderlicher Medikamente). Die Analgosedierung wurde durch 1 µg/kg/h Sufentanil<sup>6</sup> und 2 mg/kg/h Propofol<sup>7</sup> aufrechterhalten. Als Volumensubstituent wurde Ringer-Acetat<sup>5</sup> mit 3-5 ml/kg/h zentralvenös infundiert. Zur Infektionsprophylaxe wurde mit Beendigung der operativen Eingriffe ein Zweitgenerations-Cephalosporin (Cefuroxim®)<sup>7</sup> zentralvenös appliziert und in achttündigen Intervallen bis Versuchsende wiederholt gegeben (Tagesdosis 150 mg/kg). Die Körperkerntemperatur wurde über Nasensonden ermittelt und zwischen 37,5° C und 39° C gehalten ggf. unter Einsatz von Wärmedecken (Bair Hugger® Modell 540)<sup>11</sup>.

### **2.3.6 Versuchsende**

48 Stunden nach der Intervention wurden die Tiere mit 4 mg/kg Rocuronium (Esmeron®)<sup>12</sup> relaxiert. Nach einer Anschlagzeit von 2 Minuten wurden sie in tiefer Allgemeinanästhesie mit Kaliumchlorid (Kaliumchlorid 7,45%® gefärbt)<sup>5</sup> durch eine letale Dosis von 2 mmol/kg getötet. Rocuronium verhinderte dabei normalerweise auftretende Faszikulationen und Kontraktionen. Wenige Minuten vor Versuchsende wurde am linken Hinterlauf der Nervus tibialis chirurgisch freigelegt und mit feuchten Kompressen abgedeckt, um diesen als Negativprobe gemeinsam mit den anderen Nerven zügig exzidieren zu können. Post mortem erfolgte die sofortige Wiedereröffnung der OP-Gebiete zur Entnahme aller Interventionsnerven inklusive des Nullnervs und des Maximaltraumas. Zuletzt wurde das allogene Material entfernt und die Tierkörper entsorgt.

---

<sup>11</sup> Arizant Healthcare Inc., Eden Prairie, MN 55344, USA

<sup>12</sup> Essex Pharma, 5340 BH Oss, Niederlande

### **2.3.7 Ausbau und Fixierung der Nerven**

Nach Wiedereröffnung der Axillarregionen konnten alle Interventionsnerven mit Hilfe der Photographien wie geplant reidentifiziert werden. Die Nerven wurden auf Höhe der orthogonal gesetzten Markierungen und davon ausgehend ca. 2 cm proximal mit Ligaturen versehen und außerhalb dieser abgesetzt. Nach vergleichbarem Procedere wurden die Kontrollnerven exzidiert. Unmittelbar nach Entnahme wurden die Präparate mit einem Holzstäbchen geschient und für 48 Stunden in vierprozentiger Formalinlösung fixiert.

## **2.4 Histologische Methoden**

### **2.4.1 Vorbereitung und Schneiden der Proben**

Nach ausreichender Fixierung der Präparate wurden die Holzstäbchen und Ligaturen entfernt, um das Nervenmaterial manuell in Paraffin einzubetten. Nach Aushärtung der Paraffinblöcke waren diese auf den Böden der Einbettungskassetten befestigt. Zur Weiterverarbeitung wurden die Kassetten mit randomisierten Zahlen versehen. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Nerven bis zur statistischen Auswertung verblindet behandelt.

Am Rotationsmikrotom (HM 340 E)<sup>13</sup> wurden die Nerven in Längsrichtung vollständig in 5 µm dicke Gewebeschichten geschnitten und anschließend zu gleichen Teilen auf Objektträger für Standardgewebefärbungen und für immunhistochemische Färbungen aufgetragen (Standard Objektträger bzw. Superfrost® Plus Objektträger)<sup>14</sup>. Dabei lag folgendes Schnittschema zu Grunde: 2 Schnitte auf einen Standard Objektträger, 4 Schnitte auf einen Superfrost® Plus Objektträger, 2 weitere Schnitte auf den vorherigen Standard Objektträger. Dieser Zyklus wurde während des gesamten Mikrotomierens beibehalten. Nach fortlaufender Nummerierung der Schnitte wurden die belegten Objektträger im Heizschrank bei 60° C für 6 Stunden getrocknet.

---

<sup>13</sup> Microm International GmbH, 69190 Walldorf, Deutschland

<sup>14</sup> Menzel GmbH & Co. KG, 38116 Braunschweig, Deutschland



### **2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Substrate Hämatoxylin und Eosin gehören zu den Standardgewebefärbungen und bilden die Verteilung von sauren und basischen Zellbestandteilen ab. Hämatoxylin (bzw. Hämaun als basisches Derivat) ist basisch. Es färbt alle basophilen Moleküle blau, v. a. den Zellkern und das raue endoplasmatische Retikulum. Eosin ist basophil. Es färbt daher intrazelluläre Plasmaproteine rot (92).

Alle Proben auf Standard Objektträgern wurden durch einen Linear-Färbeautomat (COT 20)<sup>15</sup> mit Hämatoxylin-Eosin nach Mayer<sup>16</sup> gefärbt [s. 2.4.5 Färbeprotokolle, Tab. 2]. Abschließend wurden die Gewebeschnitte durch Auflegen eines Deckglases mittels Eindeckautomaten (Promounter® RCM 2000)<sup>15</sup> versiegelt.

### **2.4.3 Markscheidenfärbung nach Kluver-Barrera**

Zentrales Substrat in der Markscheidenfärbung nach Kluver-Barrera ist ein Chlorophyll-ähnlicher Farbstoff, der sich spezifisch an das Neurokeratingerüst anlagert. Dieses Ringmolekül ist ein basischer Kupferkomplex (Cu-Phthalozyanin), der blau erscheint und Bestandteil der Luxol-Fast-Blue® Färbemethode ist. Es färbt Markscheiden leuchtend blau, graue Substanz blass-grün, Nissl-Substanz und Zellkerne dunkelblau und Gliazellen in verschiedenen Blautönen. Ein Untergang von Gliazellen zeigt sich durch eine relative Farblosigkeit betroffener Faszikel zu in der Umgebung liegenden Faszikeln (46).

Von jedem Nerv wurde ein Superfrost® Plus Objektträger gefärbt [s. 2.4.5 Färbeprotokolle, Tab. 3]. Dieser wurde aus dem Bereich ausgewählt, an dem die stärkste Entzündungsreaktion in der HE-Färbung gefunden wurde.

Die Markscheidenfärbung wurde von den Mitarbeitern des neuropathologischen Instituts des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM) am Standort Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Pagenstecher durchgeführt.

### **2.4.4 Immunhistochemische CD68-Färbung**

Die CD68-Färbung ist ein enzymgekoppelter Immunoassay (EIA), bei dem eine Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zu einer indirekten Anfärbung spezifischer Proteine führt.

---

<sup>15</sup> Medite GmbH, 31303 Burgdorf, Deutschland

<sup>16</sup> Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland

Nach der Anfärbung erscheinen alle Zellen, die den CD68-Differenzierungskluster tragen, lichtmikroskopisch in einem braunen Farbton und werden mit hoher Sensitivität und Spezifität detektierbar.

Die nachzuweisenden Antigene (CD68) müssen initial durch eine spezielle Vorbehandlung mit Trypsin „demaskiert“ werden. Die Bindungseigenschaften von Antikörpern hängen vom Umgebungs-pH ab, weshalb Pufferlösungen eingesetzt werden, die während allen Phasen des Färbeprotokolls optimale Reaktionsbedingungen schaffen. Antikörper werden durch eine chemische Farbreaktion sichtbar gemacht, wodurch sie das gebundene Antigen indirekt nachweisen. Je nach Assay können ein oder mehrere Antikörper konsekutiv an den gebildeten Immunkomplex binden. In enzymabhängigen Assays wird der Farbeindruck durch antikörpergebundene Enzyme, die chromogenes Substrat umwandeln, bewirkt. Als Referenz werden Gewebeschnitte verwendet, deren Gehalt an gefärbtem Antigen bekannt ist.

CD68 ist ein glykosyliertes Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa, das in Lysosomen und Phagosomen von Zellen des monozytären Phagozytosesystems (MPS) vorkommt. Als Teil der initialen Vorbehandlung wird die endogene Peroxidase der MPS-Zellen kompetitiv gehemmt, da sie die Anwesenheit enzymgekoppelter Antikörper imitieren kann und so zu falsch positiven Ergebnissen führt. Der Erfolg der Blockierung wird durch Zugabe 0,6%-igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in methanolischer Lösung überprüft. Die Farbreaktion wird nach der ABC-Methode durchgeführt. Hierbei wird der Primärantikörper gegen CD68 in einem zweiten Arbeitsschritt mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser zweite Antikörper trägt am  $\text{F}_c$ -Teil ein Avidin-Biotin-haltiges Makromolekül, das exogene Peroxidase komplexiert. Auf diesen Komplex wird nun ein gebräuchliches Chromogen (Diaminobenzidintetrahydrochlorid = DAB) gegeben, das mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  katalytisch zu einem Farbstoff umgesetzt wird, der im Lichtmikroskop MPS-Zellen in einem kräftigen Brauntönen preisgibt.

Neben dem reinen Nachweis der monozytären Zellen (hier Makrophagen und Monozyten) können diese von anderen inflammatorischen Zellen, wie bspw. Neutrophilen, abgegrenzt werden.

Von jedem Nerv wurde ein Superfrost® Plus Objektträger gefärbt [s. 2.4.5 Färbeprotokolle, Tab. 4]. Dieser wurde aus dem Bereich ausgewählt, an dem die

stärkste Entzündungsreaktion in der HE-Färbung gefunden wurde. Die immunhistochemische Färbung wurde vom pathologischen Institut des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM) am Standort Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Moll durchgeführt.

#### 2.4.5 Färbeprotokolle

##### *Färbeprotokoll HE-Färbung:*

1. Xylol	3	Minuten
2. Alkohol 100%	2	Minuten
3. Alkohol 96%	1	Minute
4. Aqua dest.	1	Minute
5. Hämalan	4	Minuten
6. Aqua dest.	2	Minuten
7. Eosin	3	Minuten
8. Alkohol 96%	2	Minuten
9. Alkohol 100%	2	Minuten
10. Xylol	2	Minuten

**Tabelle 2** Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin

##### *Färbeprotokoll Kluver-Barrera-Färbung:*

1. Entparaffinieren		
2. Spülung mit Ethanol 96%	10	Minuten
3. Inkubation in Luxollösung <sup>1</sup> bei 56° C	120	Minuten
4. Rehydrieren	12	Minuten
5. Spülung mit Natronlauge 0,01%	10	Minuten
6. Spülung mit Aqua dest.	1	Minute
7. Gegenfärbung mit Kresylviolett <sup>2</sup> bei 56° C	6	Minuten
8. Dehydrieren	5	Minuten
9. Spülung mit Xylol		

**Tabelle 3** Färbeprotokoll Kluver-Barrera

- 1) Luxolechtblaulösung: 0,13 g Luxolechtblau MBSN werden in 10 ml 10%-iger Essigsäure gelöst und 190 ml Ethanol 96% zugefügt; vor Gebrauch filtrieren.
- 2) Kresylechtviolettlösung: 0,1 g Kresylechtviolett werden in 100 ml Aqua dest. gelöst und 20 Tropfen Essigsäure 10% zugegeben; vor Gebrauch filtrieren.

**Färbeprotokoll CD68-Antikörper-Färbung:**

1. Entparaffinieren und Rehydrieren	20	Minuten
2. Blockierung der endogenen Peroxidase	30	Minuten
3. Trypsinierung zur Demaskierung der Antigene	15	Minuten
4. Spülung mit Aqua dest.	2	Minuten
5. Spülung mit Phosphat-Puffer-Lösung (PBS)	5	Minuten
6. Inkubation mit Primärantikörper bei 37° C	60	Minuten
7. Spülung mit WashBuffer <sup>1</sup>	5	Minuten
8. Inkubation mit Sekundärantikörper	30	Minuten
9. Spülung mit WashBuffer <sup>1</sup>	5	Minuten
10. Inkubation mit Avidin-Biotin-Complex	30	Minuten
11. Spülung mit PBS	5	Minuten
12. Inkubation mit DAB-Substratlösung	10	Minuten
13. Spülung in Aqua dest.	3	Minuten
14. Gegenfärbung in Hämalaun	1	Minute
15. Bläuen	2	Minuten
16. Dehydrieren	5	Minuten

**Tabelle 4**      **Färbeprotokoll Immunhistochemie***1) Clearingreagens***2.5 Statistische Methoden**

Die gefärbten Präparate wurden ausschließlich am Lichtmikroskop (Olympus BX 51)<sup>17</sup> in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung untersucht. Zur Graduierung des erwarteten Traumas wurde ein histologischer Trauma-Score in Anlehnung an Steinfeldt et al. verwendet, in den alle drei Färbungen einfließen (86;87). Pro Objektträger wurde dem Score entsprechend ein Wert zwischen 0 und 4 vergeben. Sämtliche Ergebnisse wurden durch zwei weitere verblindete Personen reevaluiert, die zuvor in der Auswertung geschult wurden (Mitglieder der Arbeitsgruppe). Abweichende Werte wurden diskutiert, um sich gemeinsam auf einen definitiven Score zu einigen. Bei fortbestehender Uneinigkeit wurden betreffende Präparate von einem Pathologen (Dr. W. Nimphius, Institut für Pathologie, UKGM Marburg) graduiert. Der Nachweis für das

<sup>17</sup> Olympus Deutschland GmbH, 20097 Hamburg, Deutschland

Vorliegen dabei beurteilter inflammatorischer Zellen wurde durch die abschließende immunhistochemische CD68-Färbung erbracht.

Der höchste gefundene Score innerhalb eines jeweiligen Nerven wurde als Wert für die statistische Auswertung übernommen. Die so durchgeführte Anwendung des histologischen Trauma-Scores ermöglichte eine weitgehend anwenderunabhängige Bewertung der Nervenläsionen. Histologische Photographien wurden mit einem Photomikroskop (Olympus BX 51)<sup>17</sup> aufgenommen

### **2.5.1 Der histologische Trauma-Score**

Der histologische Trauma-Score bewertet drei Hauptmerkmale, deren Intensität und Kombination in fünf Grade eingeteilt werden. Analysiert wurde das Auftreten einer inflammatorischen Reaktion, intraneurale Hämatome und Myelinschädigungen [s. Tab. 5]. Aufgrund ihrer Färbeeigenschaften konnten inflammatorische Zellen am besten in der CD68-Färbung, Hämatome in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Myelinschäden in der Kluver-Barrera-Färbung beurteilt werden. Die primäre Auswertung aller Nerven wurde an HE-gefärbten Schnitten durchgeführt. Aus dem Bereich mit dem am stärksten bewerteten Schaden innerhalb eines jeden Nerven wurde ein Kluver-Barrera-gefärbter Objektträger mikroskopiert, um einen fraglichen Myelinschaden zu verifizieren. Die Antikörper-Färbung diente zum definitiven Nachweis intraneuraler inflammatorischer Zellen.

<i>Score</i>	<i>Definition</i>
0	Kein Zeichen eines Traumas
1	Kleinere Bereiche mit dezenter Akkumulation inflammatorischer Zellen
2	Großflächige Bereiche mit massiver Akkumulation inflammatorischer Zellen
3	Bereiche mit definitiven Zeichen einer Inflammation und Hämatom
4	Bereiche mit definitiven Zeichen einer Inflammation und Myelinschaden

**Tabelle 5**      **Der histologische Trauma-Score**

### **2.5.2 Fallzahlberechnung**

Die Anzahl der zu injizierenden Nerven wurde so kalkuliert, dass bei einer statistischen Teststärke (Power) von 90% ein signifikanter Unterschied zwischen den

Injektionssubstanzen durch eine Abweichung von wenigstens einem Score-Wert feststellbar sein sollte. Zusätzlich stützte sich die Fallzahlberechnung auf eine geschätzte Standardabweichung von 0,5 Score-Punkten und auf ein Signifikanzniveau von 5% (Anteil falsch-positiver Ergebnisse). Neben den beiden Interventionsgruppen (*R* und *B*) wurde auch die Negativkontrolle als dritte Gruppe zur Berechnung mit einbezogen, wobei pro Versuchstier eine Negativkontrolle und maximal drei Interventionsnerven pro Substanz entnommen werden sollten [s. 2.3.2 Versuchsgruppen und 2.3.4 Axilläre und tibiale Interventionen]. Deshalb ergab sich ein inhomogenes Verhältnis der Versuchsgruppengrößen. Die Fallzahl wurde auf Basis eines Tukey-Kramer-Tests<sup>18</sup> geschätzt. Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben wurde mit dem Programm „PASS 2002 statistical package“<sup>19</sup> für die beiden Interventionsgruppen insgesamt eine notwendige Nervenzahl von 40 zu je gleichen Teilen für Gruppe *R* und *B* berechnet, weshalb sieben Schweine in die Studie aufgenommen werden mussten.

### **2.5.3 Auswertung**

Da zur Vergabe der Score-Grade galt, keine gebrochenen sondern ausschließlich ganze Zahlen zu definieren, wurden die Gesamtwerte für die jeweiligen Gruppen als Mediane mit 25. und 75. Perzentil angegeben. Dem folgend wurden nicht-parametrische Tests für die statistische Auswertung verwendet. Dazu wurden die Daten ordinalskaliert und Rangsummen bzw. mittlere Ränge gebildet. Zunächst galt es, einen globalen Vergleich der Interventionsgruppen und der Negativkontrolle mit dem Kruskal-Wallis-Test durchzuführen. Bei Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes -gemäß dieses Tests- war eine paarweise Testung der jeweiligen Gruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test<sup>20</sup> indiziert. Das Signifikanzniveau wurde für alle Vergleiche auf  $\alpha=0,05$  festgelegt. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS<sup>21</sup> Version 15.0 für Windows angewendet.

---

<sup>18</sup> *Tukey-Kramer-Test*: parametrischer Test zur Bestimmung der maximalen Differenz von Mittelwerten beim Vgl. inhomogener Stichprobengrößen. Die Fallzahl kann daraus abgeleitet werden.

<sup>19</sup> Numbers Cruncher Statistical Systems Inc., Kaysville, USA

<sup>20</sup> *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test*: nicht-parametrischer Test zum Vgl. mittlerer Rangsummen einer ordinalskalierten Variable genau zweier unabhängiger Stichproben.

<sup>21</sup> SPSS Inc., Chicago, IL 60606, USA

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Versuchtiere**

Wie geplant konnten sieben Versuchstiere erfolgreich in die Studie eingeschlossen und anästhesiert werden. Im Verlauf der Versuchstage zeigte kein Schwein relevante Entzündungszeichen innerhalb der Operationsgebiete oder Symptome einer systemischen Infektion. Es gab keine kardiopulmonalen Komplikationen. Alle Tiere überlebten die geplante Versuchsdauer von 48 Stunden und starben erst durch die iatrogene Injektion von Kaliumchlorid.

#### **3.2 Traumatisierung und Aufarbeitung der Nerven**

Wie beschrieben konnten in jeder Axilla anhand der typischen Topographie der Gefäß-Nerven-Straße bis zu drei Nerven behandelt werden, so dass pro Versuchstier insgesamt sechs Nerven bzw. bei einem Tier vier Nerven zu gleichen Anteilen beider Interventionsgruppen entnommen werden konnten. In etwa einem Drittel aller Nerven musste wenigstens einmal, maximal zweimal die Nadellage korrigiert werden, um das Zielvolumen intraneural zu applizieren [s. 2.3.4 Axilläre und tibiale Interventionen]. Dabei traten keine makroskopisch erkennbaren Einblutungen oder grobe Inzisionen durch die Punktion auf. Insgesamt konnten den Versuchstieren 54 Nerven (7 Negativkontrollen, 7 Positivkontrollen, je 20 Nerven der Gruppe R und Gruppe B) problemlos entnommen werden.

Nach dem Fixieren maßen alle Präparate eine Länge von 1,0-1,5 cm und einen Durchmesser von 0,2-0,4 cm. Beim Mikrotomieren wurden 14141 Schnitte hergestellt, die nach der beschriebenen Systematik aufgearbeitet wurden. Alle 54 exzidierten Nerven konnten histologisch ausgewertet werden [s. Tab. 6].

### 3.3 Histologische Beurteilung

**Hämatoxylin-Eosin-Färbung:** In 41 der 54 Nerven wurde eine dezente bis massive Ansammlung inflammatorischer Zellen gefunden. Davon entfielen 15 Nerven auf Gruppe R und 17 Nerven auf Gruppe B. Intraneurale Hämatome wurden ausschließlich in maximal traumatisierten Nerven detektiert. Myelinschäden konnten in der HE-Färbung nur unzureichend beurteilt werden [s. Abb. 8.1/ 8.2].

Insgesamt 8 der 40 Interventionsnerven entwickelten keine inflammatorischen Zeichen oder stärkere Schäden. Auseinandertreibung der Nervenfasern im Längsverlauf und Aufquellung des Perineuriums wurde nur qualitativ begutachtet und trat unabhängig vom histologischen Grad der Schädigung auf. In der statistischen Auswertung fanden diese Kriterien keine weitere Berücksichtigung [s. Tab. 6].

**Kluver-Barrera-Färbung:** Myelinschäden traten in insgesamt 12 der 54 Nerven auf. Davon entfallen 7 auf Maximaltraumata, 3 auf Gruppe R und 2 auf Gruppe B. Alle Negativkontrollen waren gleichmäßig und regelgerecht angefärbt, was bedeutet, dass keine Myelinschädigungen vorhanden waren. Bei den Positivkontrollen waren alle Faszikel geschädigt, gingen aber nicht zwangsläufig mit Hämatomen einher, jedoch immer mit massiver Akkumulation inflammatorischer Zellen. Die fünf myelingeschädigten Nerven aus den Gruppen R und B zeigten eine Akkumulation inflammatorischer Zellen in unterschiedlich starker Ausprägung. Intraneurale Hämatome lagen nicht vor. Myelinschäden lagen nach Injektionstrauma in allen betroffenen Nerven jeweils in einem Faszikel vor [s. Abb. 9.1/ 9.2]. Diese Schäden traten mit einer Häufigkeit von 12,5% (insgesamt 5 der 40 Nerven aus Gruppe R und B) nach intraneuraler Injektion auf [s. Tab. 6]. Sie verteilen sich auf fünf verschiedene Versuchstiere mit jeweils einem myelingeschädigten Nerven.

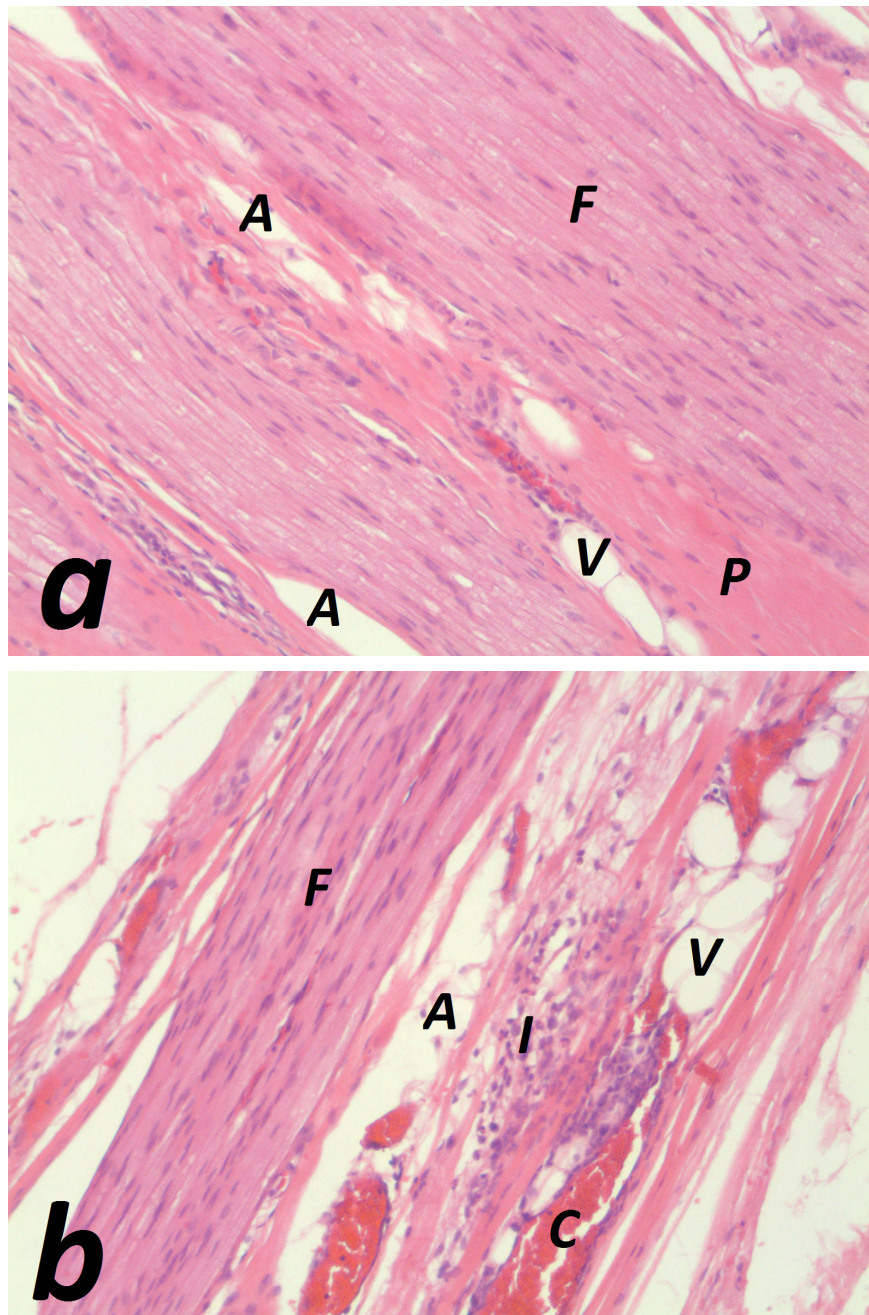
**Immunhistochemische Färbung:** In den 41 Nerven mit inflammatorischer Reaktion konnten monozytäre Zellen über CD68-Antikörper nachgewiesen werden [s. Tab. 6; Abb. 10]. Das Ausmaß der Zellinvasion in der primär beurteilten HE-Färbung konnte in allen Nerven bestätigt werden. Eine nachträgliche Korrektur der initial bestimmten Score-Werte war daher nicht notwendig.



	<i>Gruppe R</i>	<i>Gruppe B</i>	<i>Negativkontrolle</i>	<i>Positivkontrolle</i>
<i>Anzahl Nerven (n)</i>	20	20	7	7
<i>Histologische Schnitte (n)</i>	4876	4633	2180	2452
<i>Keine inflammatorischen Zeichen (n) in HE Score 0</i>	5	3	5	0
<i>Dezente oder massive Inflammation (n) in HE Score 1 oder 2</i>	15	17	2	2
<i>Hämatome (n) in HE Score 3</i>	0	0	0	5
<i>Myelinschäden (n) in KB Score 4</i>	3	2	0	7

**Tabelle 6**      **Übersicht zur Verteilung der einzelnen Schadensentitäten auf die jeweiligen Versuchsgruppen.**

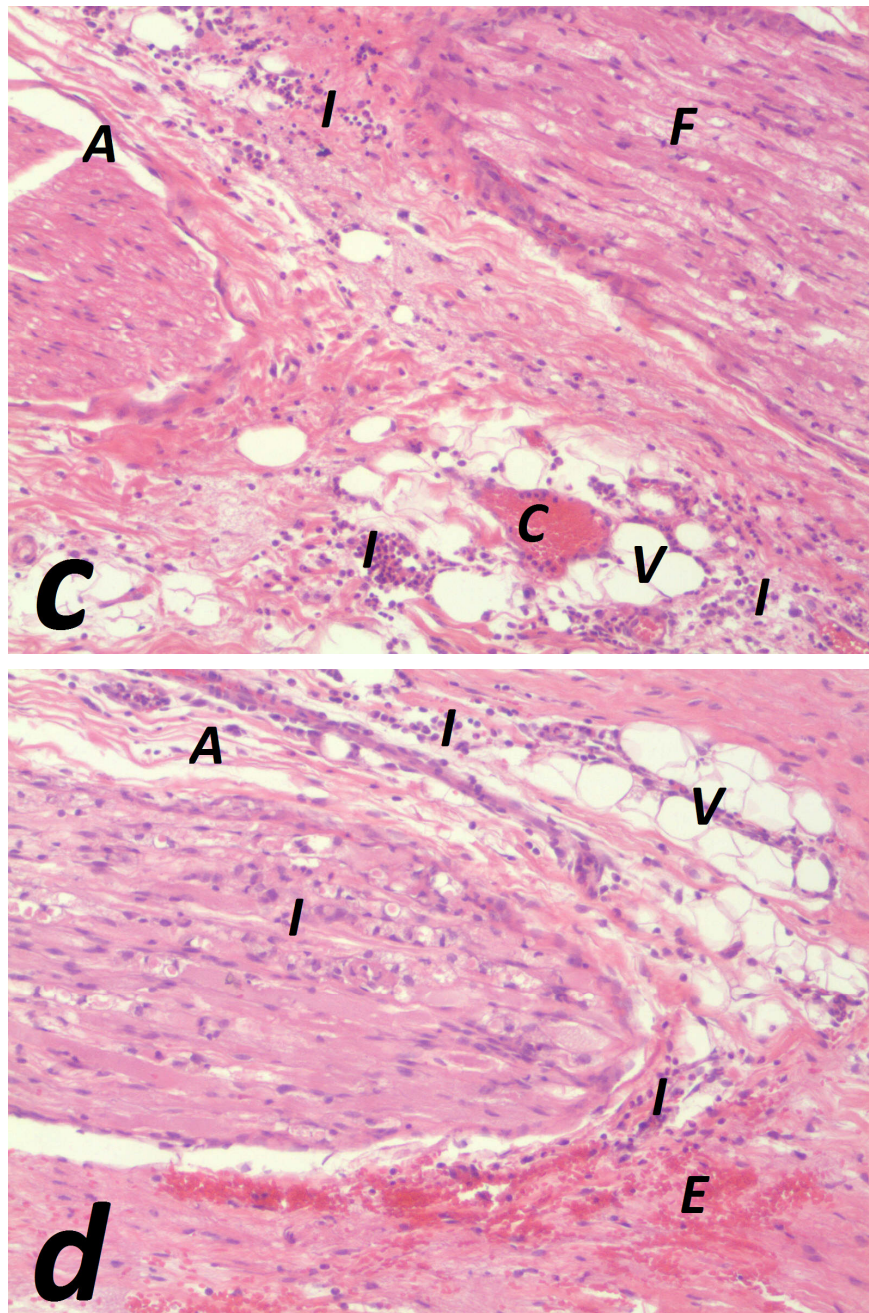
*n*, Anzahl der Nerven; *HE*, Hämatoxylin-Eosin-Färbung; *KB*, Markscheidenfärbung nach Kluver-Barrera; *SD*, Standardabweichung; *CD68*, immunhistochemische Monozyten-Färbung mit CD68-Antikörpern



**Abbildung 8.1 Schadensgraduierung in der HE-Färbung**

A, Artefakt; C, Kapillare; I, inflammatorische Zellen; F, Faszikel; P, Perineurium; V, (Fett-)Vakuole

- a)** Längsschnitt (200fache Vergrößerung), HE-Färbung eines unbehandelten N. tibialis, Score 0: gesunder Nerv
- b)** Längsschnitt (200fache Vergrößerung), HE-Färbung eines N. medianus der Gruppe R, Score 1: vereinzelte perineurale/paravasale Akkumulation inflammatorischer Zellen

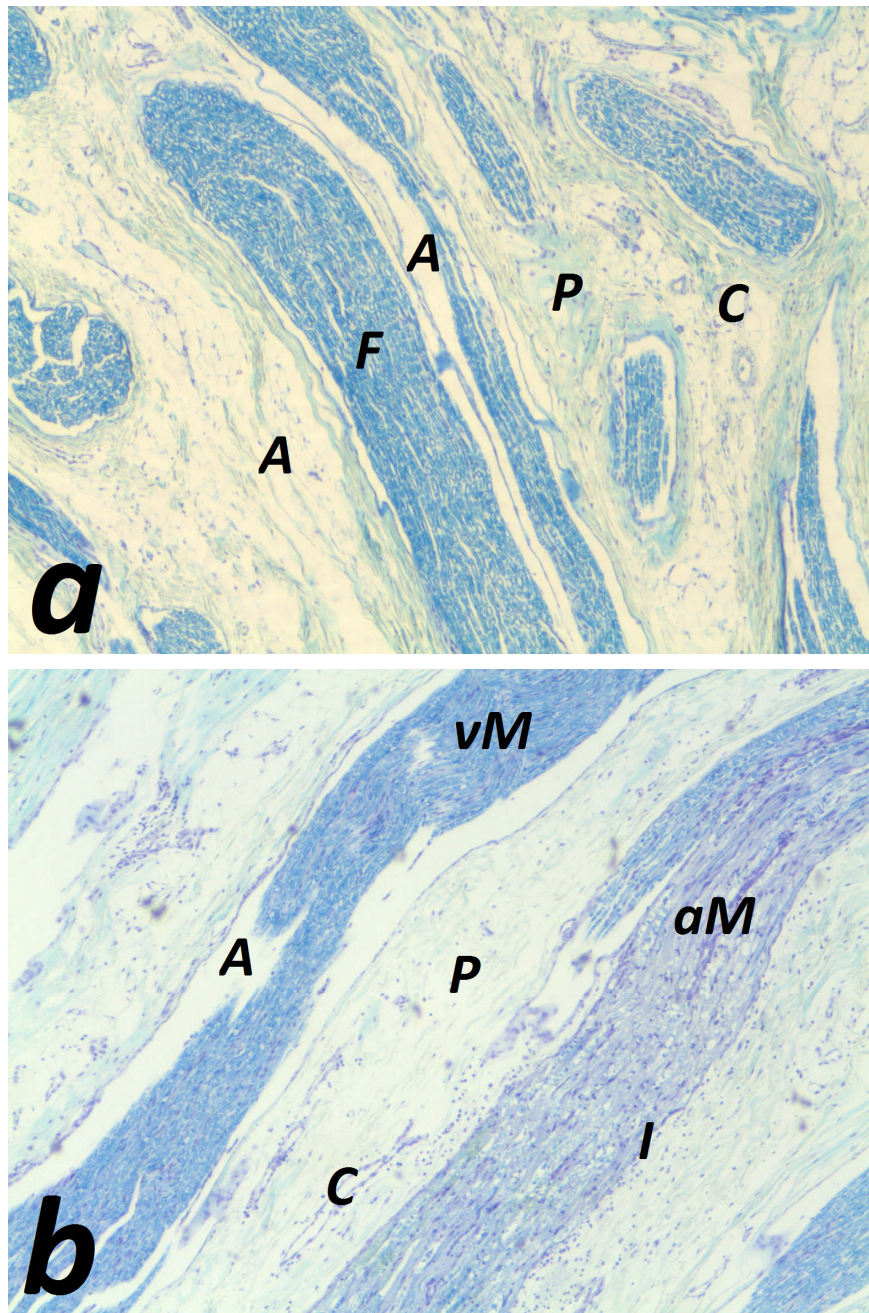


**Abbildung 8.2 Schadensgraduierung in der HE-Färbung**

A, Artefakt; E, Erythrozytenakkumulation; I, inflammatorische Zellen; V, (Fett-)Vakuole

- c) Längsschnitt (200fache Vergrößerung), HE-Färbung eines N. medianus der Gruppe B, Score 2: disseminierte perineurale/faszikuläre Akkumulation inflammatorischer Zellen
- d) Längsschnitt (200fache Vergrößerung), HE-Färbung eines maximal traumatisierten N. tibialis, Score 3: zusätzlich perineurales Hämatom

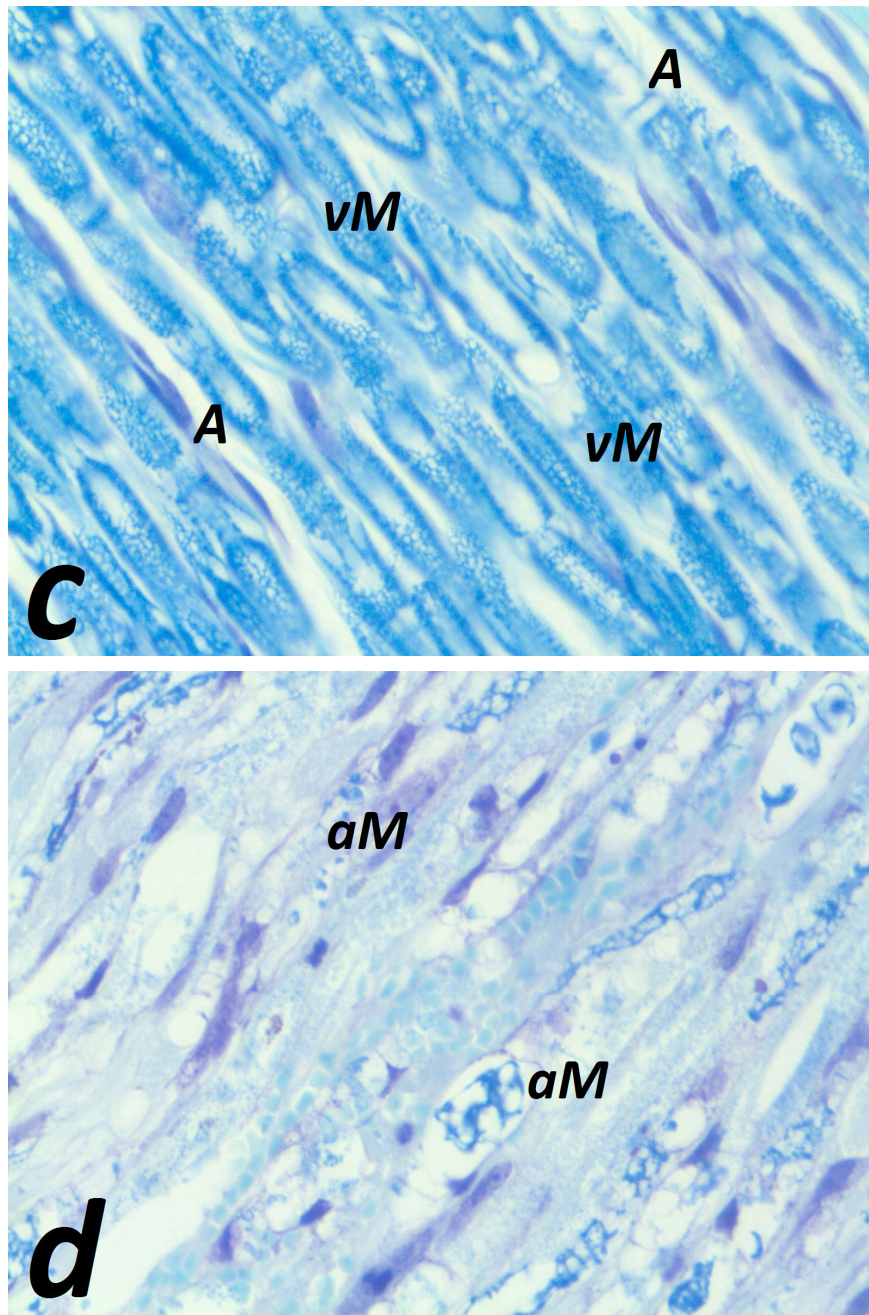




**Abbildung 9.1 Myelinschäden in der Kluver-Barrera-Färbung**

A, Artefakt; C, Kapillare; F, Faszikel; I, inflammatorische Zellen; P, Perineurium; aM, avitales Myelin; vM, vitales Myelin

- a)** Längsschnitt (40fache Vergrößerung) eines N. radialis der Gruppe R, gesunde Faszikel in der Übersicht
- b)** Längsschnitt (40fache Vergrößerung) eines N. ulnaris der Gruppe B, Vergleich eines vitalen und avitalen Faszikels in der Übersicht

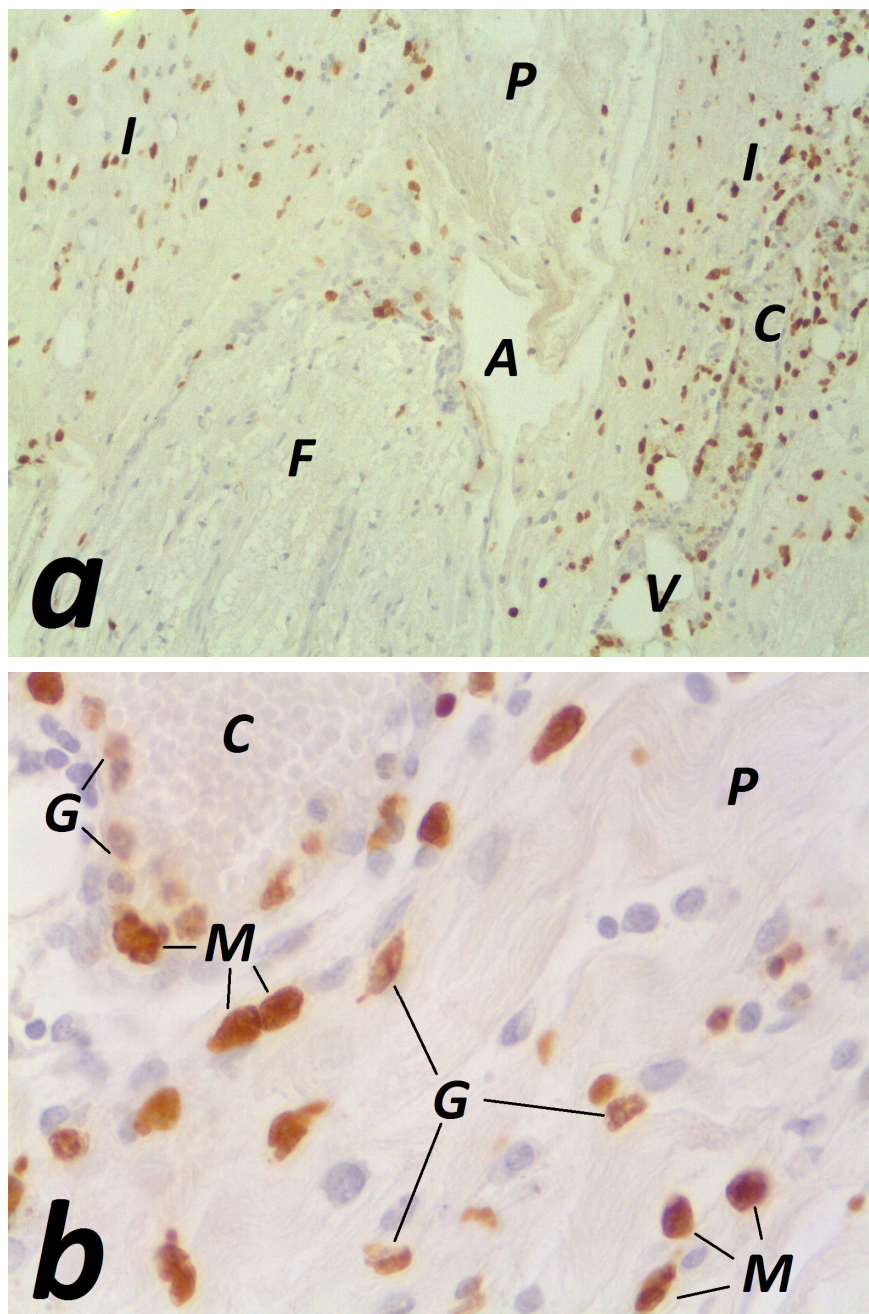


**Abbildung 9.2** Myelinschäden in der Kluver-Barrera-Färbung

*A, Artefakt; aM, avitales Myelin; vM, vitales Myelin*

- c)** Längsschnitt (400fache Vergrößerung) eines N. radialis der Gruppe R, vitales Myelin
- d)** Längsschnitt (400fache Vergrößerung) eines N. ulnaris der Gruppe B, Score 4: avitales Myelin





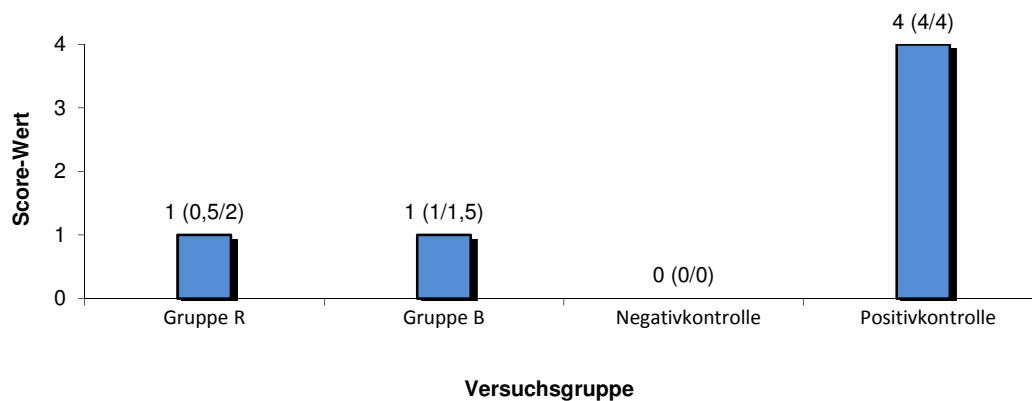
**Abbildung 10** Nachweis inflammatorischer Zellen durch CD68-Antikörper

A, Artefakt; C, Kapillare; F, Faszikel; I, inflammatorische Zellen als G, Granulozyten und M, Monozyten; P, Perineurium; V, (Fett-)Vakuole;

- a)** Längsschnitt (200fache Vergrößerung) eines *N. medianus* der Gruppe B, perikapilläre/ perineurale Infiltration inflammatorischer Zellen sowie vereinzelt faszikulär
- b)** Längsschnitt (400fache Vergrößerung) eines *N. medianus* der Gruppe B, perikapilläre/ perineurale Infiltration inflammatorischer Zellen

### 3.4 Graduierung der histologischen Befunde

Zur Graduierung der einzelnen Nerven waren im Sinne des Trauma-Scores nur die Schnitte mit der stärksten Schadensausprägung ausschlaggebend. Bei der Zusammenfassung der Einzelwerte auf die jeweiligen Versuchsgruppen ergaben sich folgende **mediane Score-Werte** mit 25. und 75. Perzentil [s. Abb. 11]:



**Abbildung 11** Ergebnisse des histologischen Trauma-Scores. Mediane Score-Werte der einzelnen Versuchsgruppen, in Klammern 25. und 75. Perzentil.

**Ergebnisse des Kruskal-Wallis- und des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests:** Im globalen Testverfahren wurde ein p-Wert von 0,022 berechnet. Daher konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Injektionsgruppen und der Negativkontrolle vorliegt. Beim paarweisen Vergleich der Injektionsgruppen mit der Negativkontrolle ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied (Gruppe B vs. Negativ p=0,002 ; Gruppe R vs. Negativ p=0,007). Kein signifikanter Unterschied lag beim Vergleich der Injektionsgruppen vor (Gruppe B vs. Gruppe R p=0,772). Zusammengefasst kommen in dieser Studie injektionsassoziierte Nervenschäden mit signifikanter Häufigkeit unabhängig von der verwendeten Substanz vor. Dabei folgt nicht auf jede intraneurale Injektion eine neuroinflammatorische Antwort oder eine schwere histologische Nervenläsion [s. Tabelle 6/ 7].

---

<i>Verglichene Gruppen</i>	<i>p-Wert</i>
global	0,022
Gruppe B vs. Negativkontrolle	0,002
Gruppe R vs. Negativkontrolle	0,007
Gruppe R vs. Gruppe B	0,772

**Tabelle 7**      **Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests und des U-Tests nach Wilcoxon-Mann-Whitney.**

*Signifikantes Ergebnis im globalen Vergleich aller drei Gruppen miteinander, sowie beim Vergleich von Gruppe B und Gruppe R jeweils mit den Negativkontrollen. Im direkten Vergleich von Gruppe R und B lag kein signifikanter Unterschied vor.*



## 4. Diskussion

### 4.1 Ergebnisse

Mit der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass schwere Nervenläsionen (Myelinschäden) nach intraneuraler Injektion im porcinen Modell in etwa 12% der Fälle auftreten. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant. Der Schädigungsgrad nach Applikation von Ringerlösung unterscheidet sich dabei nicht von dem des Lokalanästhetikums Bupivacain in 0,5%-iger Konzentration. Diese Beobachtung gilt für alle in der vorliegenden Untersuchung bewerteten Schadensentitäten: Inflammatorische Reaktion, intraneurale Hämatome und Myelinschädigungen.

### 4.2 Ergebnisse im Kontext vorliegender Literatur

Die vorliegende Untersuchung konnte zeigen, dass histologisch nachweisbare Nervenschäden nach intraneuraler Injektion auftreten, so wie auch schon Selander et al. und Whitlock et al. beschreiben konnten (79;93). Weiterhin wurde beobachtet, dass bereits die intraneurale Applikation einer Vollelektrolytlösung Schäden verursacht, die denen von Bupivacain entsprechen. Ein potenzieller neurotoxischer Effekt des Lokalanästhetikums fiel somit unter den gewählten Studienbedingungen nicht auf. Eine alleinige Punktion mit Facettennadeln vom Durchmesser 24G, wie sie in diesem Versuch verwendet wurden, löst keine schweren Nervenläsionen aus (86). Intrafaszikuläre Punktionen treten dennoch auch bei dünnen Stimulationskanülen mit der hier beobachteten Häufigkeit von etwa 12% auf, werden aber erst durch eine anschließende intrafaszikuläre Injektion als eigentlichem Schadensauslöser erkennbar. Die vorherrschende Pathogenese der gefundenen Myelinschäden entspricht daher am ehesten einem Barotrauma. Durch das Barotrauma könnten Perineurium und Faszikel mechanisch zerstört worden sein, was laut Kapur und Kollegen mit einer Störung der Blut-Nerven-Schranke einhergehen könnte (42), wodurch eine sterile Inflammation hervorgerufen würde (63). Die immunologische Reaktion könnte zur Ausbildung

struktureller Nervenläsionen (Myelinschäden) führen. Unabhängig von einer strukturellen Schädigung können schon durch freigesetzte Mediatoren der immigrierten inflammatorischen Zellen (Score-Wert 1 und 2) neurologische Defizite ausgelöst werden (44;63). Myelinschäden (Score-Wert 4) stellen schwere histologische Nerventraumata dar. Ob dadurch auch mit klinischer Symptomatik zu rechnen ist, konnte bisher nicht kausal geklärt werden. Grundsätzlich scheint es offensichtlich, dass eine faszikuläre Läsion im Sinne einer Myelinschädigung von neurologischer Relevanz sein sollte.

Wie in Abschnitt 1.6 bereits angedeutet wird beim eingehenden Vergleich der Studienprotokolle bisheriger Untersuchungen zu intraneuralen Injektionen die eingeschränkte Vergleichbarkeit der jeweiligen Studienergebnisse deutlich. Sie weisen aber auch auf mehrere Einflussfaktoren hin, die bei der Beurteilung von Nervenschäden berücksichtigt werden sollten. Einige beziehen sich direkt auf histologische Veränderungen. Hierzu zählen: *Nadeltyp (Schliff)*, *Nadeldurchmesser*, *Injektionsebene im Nerv (extrafaszikulär, intrafaszikulär)*, *Injektionsdruck*, *Substanz (Typ, Konzentration)*, *Injektionsort im Nervenverlauf*, *histologische Analysekriterien*. Andere Kriterien beeinflussen dagegen die Verwertbarkeit der neurologischen Untersuchung. Dazu gehören: *Untersuchungskriterien*, *Nachuntersuchungsintervalle (Abstand zur Intervention)*, *subjektive Symptomwahrnehmung der Patienten (Intensität und Qualität)*. Diese Aspekte werden im Folgenden diskutiert.

Zunächst sollte die Methode, mit der die Position der Nadelspitze im Gewebe evaluiert wird (Ultraschallanwendung, Stimulationstechnik, Injektionsdruckmessung), kritisch betrachtet werden. Brull und Kollegen zeigten, dass bei intraneuraler Nadellage (in situ) im Ultraschallbild ein Stimulationsstrom von 0,2-0,5 mA nötig ist, um eine Kennmuskelreaktion auszulösen (19). Diese Werte gelten jedoch als Standardintervall in der klinischen Routine, bei der die Nadelspitze gerade noch extraneural liegen soll (25). Sogar bei Werten bis 1,4 mA als minimale Stimulationsschwelle soll im Einzelfall ein Nadel-Nerv-Kontakt möglich sein (85). Für den Ultraschall konnte gezeigt werden, dass eine intraneurale Injektion mit ausreichender Sicherheit erkannt werden kann (19). Die Auflösung genügt jedoch noch nicht, um eine extrafaszikuläre von einer intrafaszikulären Injektion abzugrenzen (11). Eine Zunahme des Nervendurchmessers

im Ultraschallbild durch die Injektion stellt zumindest keinen Surrogatparameter für histologische bzw. funktionelle Nervenläsionen dar (58). Hadzic und Kollegen zu Folge korreliert die Schwere der neurologischen Beschwerden mit der *Höhe des Injektionsdrucks*, wobei hohe Drücke klinisch relevante Symptome auslösen sollen, niedrige dagegen nicht (36). In einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe mit vergleichbarer Methodik gehen jedoch nur 40% der intraneuralen Injektionen mit hohen Injektionsdrücken einher (42). Hadzic und Kollegen postulieren daher, dass Nervenschäden möglicherweise nur nach direkter Injektion in Faszikel auftreten, stromale bzw. extrafaszikuläre Injektionen dagegen zu keiner relevanten Immunantwort oder axonalen Demyelinisierung führen (36). Lupu et al. fanden keinen statistischen Zusammenhang zwischen maximalen Injektionsdrücken und Ausprägung histologischer Veränderungen (58). Die Nachbeobachtungsintervalle waren in allen Arbeiten gleich, allerdings gibt es deutliche Abweichungen in den neurologischen und histologischen Beurteilungskriterien (36;42;58). Ob eine definitive Korrelation zwischen Injektionsdruck und Histologie bzw. Injektionsdruck und Neurologie vorliegt, konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden. Dennoch sprechen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Whitlock für die Schlussfolgerungen von Hadzic und Kollegen, denn auch hier traten im Gegensatz zur extrafaszikulären Injektion deutlich schwerere Nervenschäden nach intrafaszikulärer Injektion auf (36;93).

Sowohl bei Selander et al. als auch bei Hadzic et al. und Whitlock et al. kann nicht exakt nachvollzogen werden, wie ihre Methodik eine intrafaszikuläre Injektion garantiert, um diese von einer extrafaszikulären bzw. extraneuralen (in der vorliegenden Arbeit „subepineural“ bezeichnet) Injektion abzugrenzen (36;79;93). Auf intrafaszikulärer Injektionsebene werden Nervenfasern nicht mehr durch Peri- und Epineurium geschützt (11;13;19;42). Vermutlich entspricht das Perineurium einer biomechanischen Barriere, ohne dessen Penetration es nicht zu Nervenschäden mit neurologischer Symptomatik kommt (11;13;19;42). Dieser Aspekt sollte weitergehend untersucht werden. Im vorliegenden Versuch wurde durch das in-situ-Vorgehen sichergestellt, dass eine rein subepineurale Injektion ausgeschlossen wurde. Eine Unterscheidung zwischen intra- und extrafaszikulärer Nadellage wurde hierbei nicht berücksichtigt. Mit Blick auf das histologische Ergebnis ist es jedoch möglich, dass eine intrafaszikuläre Kanülenpositionierung neben einem Baro- bzw. Volutrauma als

Ursache einer Faszikelschädigung aufgetreten sein könnte. Im Falle einer intrafaszikulären Kanülenposition und anschließender Injektion vermag ein besonders schweres Trauma vorzuliegen. Publierte Daten von Steinfeldt et al. weisen jedoch darauf hin, dass Kanülen mit einem sehr geringen Durchmesser -wie in der vorliegenden Arbeit verwendet- die Faszikel nicht schädigen (86;87). Jedoch könnte im Rahmen der Nervenpunktion die schützende Funktion des Perineuriums aufgehoben werden, womit eine anschließende Injektion einen einzelnen ungeschützten Faszikel deutlicher schädigen könnte als andere Umliegende. Dieser Ansatz würde auch erklären, warum Steinfeldt et al. bei einem reinen Penetrationstrauma keine faszikulären Schäden vorfanden (86;87).

Das Schädigungsmaß durch den Einsatz unterschiedlicher *Nadelschliffe* (Facette versus Pencil Point) wurde jüngst von Steinfeldt und Kollegen untersucht, wobei kein Unterschied in der inflammatorischen Antwort festgestellt wurde (87). Schwere Nervenschäden traten hier bei keinem der beiden Nadelschliffe auf (87). Die Verwendung von Facettenschliff-Nadeln im vorliegenden Versuch stellt damit keinen Störfaktor für das Schadensausmaß dar.

Die *histologischen Analysekriterien* sind über alle Studien hinweg unterschiedlich definiert, wobei grundsätzlich Inflammation und Myelinschäden unterschieden werden können (36;58;79;93). Einige Autoren evaluieren Demyelinisierung, ohne dafür spezielle Färbungen anzuwenden, wodurch die Beurteilung limitiert ist (36;79;93). Hadzic et al. erwähnen zudem zwar Zellinfiltrationen, quantifizieren diese aber nicht (36). Lupu et al. teilen immunologische Reaktionen in Schweregrade ein und geben sie in einem reproduzierbaren Score wieder (58). Dabei werden jedoch keine weiteren Schadensentitäten wie Hämatome und Myelinschäden evaluiert, wie es in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde (58). Damit fehlten bisher wesentliche Elemente zur Schadensbeschreibung, die in ursächlichem Zusammenhang mit neurologischen Defiziten stehen könnten. Das in dieser Studie gewählte Vorgehen bezieht alle bisher bekannten Schadensentitäten ein. Eine umfangreiche Beschreibung der Nervenschädigung nach bisherigen Erkenntnissen war somit möglich.

In der Gesamtschau aller Studien wurden die Nerven nach einem *Nachuntersuchungsintervall* von 7-14 Tagen entnommen (36;58;79;93). Die immunologische Antwort wurde folglich mit großer Latenz zur Intervention und zur

neurologischen Diagnostik begutachtet, obwohl die stärkste Ausprägung der Inflammation schon nach 48 Stunden zu erwarten ist (53;68;69). Ein möglicher Zusammenhang zeitnah zur Intervention konnte somit u. U. nicht erfasst werden. Hier schließen die Ergebnisse der vorliegenden Studie eine Lücke, da bereits 48 Stunden post interventionem schwere Nervenschäden festgestellt wurden. Diese könnten frühzeitig auftretende neurologische Defizite beim Menschen erklären.

Des Weiteren sollte die Verwendung von Kleintieren (Kaninchen, Nager) in bisherigen Studien kritisch betrachtet werden (79;93). Die deutlich kleineren Nervendurchmesser und die konsekutive Verwendung dünnerer Injektionsnadeln weichen stark von der klinischen Situation am Menschen ab (79;93). Das Verhältnis von Nadel-zu-Nerv-Durchmesser könnte hier möglicherweise zu weit von der realen Praxis entfernt liegen und daher das Schädigungsmaß über- oder unterschätzen (79;93).

In der vorliegenden Studie wurden jedem Versuchstier ein Nullnerv und ein maximal traumatisierter Nerv entnommen, um systemische Einflussfaktoren zu kontrollieren (Negativkontrolle), sowie die Anwendbarkeit des histologischen Trauma-Scores zu validieren (Positivkontrolle). Histologische Auffälligkeiten der Faszikel oder des Epineuriums ohne Inflamationszeichen wurden als Artefakte gewertet.

Während der operativen Phase wurde darauf geachtet, dass außer den Interventionen keine weiteren akzidentiellen Schäden an den Zielstrukturen auftraten, soweit dies makroskopisch beurteilbar war. Lokale Gewebeirritationen durch den operativen Eingriff bewerteten bereits Steinfeldt und Kollegen unter vergleichbarem Studiendesign (86). Dafür wurden axilläre Nerven, die nahe den Interventionsnerven verlaufen, als zusätzliche Negativkontrollen histologisch untersucht (86). Es konnten keine Nervenschäden im Sinne des Trauma-Scores festgestellt werden (86). Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Studie unter der Bedingung des sorgfältigen operativen Vorgehens vorausgesetzt.

Der Informationsgewinn der vorliegenden Studie liegt gegenüber der bisherigen Studienlage darin, dass mittels der Anwendung des ordinalskalierten Trauma-Scores Schadensentitäten umfassend zugeordnet und nach Schweregraden klassifiziert werden konnten. Die Einschätzung der Schwere der histologischen Nervenläsionen

wurde somit quantifizierbar. Dieses Vorgehen scheint für ähnliche Fragestellungen -um der besseren Vergleichbarkeit Willen- gut reproduzierbar zu sein.

Mit der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, dass 48 Stunden nach intraneuraler Injektion Myelinschäden unabhängig von der injizierten Substanz in ca. 12% der Fälle auftreten. Myelinschäden könnten nach bisherigen Erkenntnissen ein histopathologisches Korrelat für neurologische Defizite sein (27;63;93). Die intraneurale Injektion sollte daher als eine mögliche Ursache für die Entstehung neurologischer Symptome betrachtet werden.

Auch wenn es offensichtlich erscheint, dass intraneural applizierte Volumina es vermögen neurologische Symptome und histopathologische Veränderungen auszulösen, so muss darauf verwiesen werden, dass gegenteilige Ergebnisse einer klinischen Untersuchung von Bigeleisen et al. vorliegen (11). Die Arbeitsgruppe führte bei 26 Patienten eine axilläre Plexusblockade mit gezielter intraneuraler Injektion unter sonographischer Kontrolle durch (11). Weder in den ersten 48 Stunden post interventionem noch nach vier Tagen, drei Wochen und sechs Monaten konnten klinisch sensible und motorische Defizite festgestellt werden (11). Mögliche Ursachen hierfür seien laut Autor die niedrige Fallzahl gegenüber der statistisch geringen Häufigkeit für Nervenschäden, defizitäre Nachuntersuchung, die fragliche Höhe des Injektionsdrucks und die Unmöglichkeit, im Ultraschallbild zwischen intrafaszikulärer Injektion und Injektion in das Nervenstroma zu unterscheiden (11).

Zusammenfassend treten Nervenschäden nicht notwendigerweise nach intraneuraler Injektion auf wie Bigeleisen et al. klinisch und die vorliegende Studie histologisch zeigen konnte, da hier 8 der injizierten Nerven ohne jegliche Schädigung blieben (11). In 80% der Fälle sollte jedoch mit einer lokalen Neuroinflammation und in ca. 12% mit Myelinschäden gerechnet werden. Dass die genannten histologischen Veränderungen zu vorübergehenden oder anhaltenden neurologischen Beschwerden führen können, ist plausibel (2;27;63). Inwiefern intraneurale Injektionen die Ursache neurologischer Symptome bei Patienten im klinischen Alltag sein könnten, bleibt jedoch unklar. Hierzu sind prospektive Studien notwendig, die neben einer sehr präzisen sonographischen Darstellung akzidentieller intraneuraler Injektionen neurologische Nachuntersuchungen beinhalten sollten.

### 4.3 Limitationen

Das gewählte Studiendesign weist einige Aspekte auf, die die Aussagekraft der Ergebnisse sowie deren Bedeutung für die klinische Praxis einschränken. Hauptlimitation ist die Nicht-Beurteilbarkeit des Zusammenhangs zwischen neurologischer Symptomatik und den in der Studie gefundenen histologischen Nervenschäden. Der intraneuralen Injektion sollte zwar wie oben beschrieben eine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung von Nervenschäden zuerkannt werden, der neurologische Status wurde in dieser Studie jedoch nicht evaluiert. Klinische und elektrophysiologische Tests hätten dabei das histologische Ergebnis beeinflussen können. Inwieweit porcine Neurologie auf den Menschen übertragbar ist, ist generell ungeklärt. Ob histologische Veränderungen mit neurologischen Beschwerden korrelieren, bedarf weiterer Untersuchungen. Wegen dieses Umstandes wurde als Zielkriterium der vorliegenden Studie ausschließlich die histologische Beurteilung gewählt.

Da die histologische Evaluation nur die Schadenssituation zum Zeitpunkt des Versuchendes (nach 48 Stunden) darstellt, kann über Reversibilität der einzelnen Schadensentitäten keine Aussage gemacht werden. Weiterhin wurde der verwendete CD68-Antikörper in der immunhistochemischen Färbung primär an Mäusen entwickelt und nur in einzelnen Tests auch für die Eignung an Hausschweinen validiert (28;86;87). Die Darstellung der Myelinschäden ist hiervon nicht beeinträchtigt.

Das operative Verfahren zur Darstellung der axillären Nervenabschnitte muss als Limitation betrachtet werden, da dieses Vorgehen nicht der klinischen Praxis entspricht. Die Gewebeintegrität der Axillarregion könnte nach Eröffnung anatomisch und physiologisch gestört sein. Zu Gunsten der in-situ-Interventionen wurden diese Einflussfaktoren in Kauf genommen. Allerdings konnten Steinfeldt et al. zeigen, dass unbehandelte Nerven ohne Schädigung blieben, die zusätzlich aus der Axillarregion als Negativkontrollen entnommen wurden bei sonst vergleichbarem chirurgischen Procedere wie in der vorliegenden Arbeit (86). Die Eröffnung der Axillarregion als solches scheint daher kein relevanter Einflussfaktor für die Entstehung von Nervenschäden zu sein (86).

Neben Lokalanästhetika wird auch dem verwendeten Cephalosporin zur antibiotischen Abdeckung ein neurotoxischer Effekt zugesprochen (34), was die Histologie beeinflusst

haben könnte. Da die Negativkontrollen jedoch histologisch unverändert waren, kann eine mögliche systemische neurotoxische Einwirkung vernachlässigt werden. Außerdem gilt das gefundene Ergebnis ausschließlich für Bupivacain. Aussagen über die Toxikologie anderer Lokalanästhetika können mit dieser Studie nicht getroffen werden.

Da es sich beim Pathomechanismus am ehesten um ein Barotrauma handelt, liegt die Vermutung nahe, dass das histologische Ergebnis mit dem Injektionsdruck korreliert. Bisherige Untersuchungen mit Injektionsdruckmessungen führen zu keiner eindeutigen Datenlage (36;42;58). Jedoch könnte das beobachtete Schädigungsmuster der vorliegenden Arbeit -monofaszikuläre Myelinschäden- am ehesten durch eine intrafaszikuläre Injektion erklärt werden, was im Wesentlichen auch den Ergebnissen von Whitlock et al. entspricht (93). Laut Hadzic et al. kann eine intrafaszikuläre Injektion womöglich durch einen erhöhten Injektionsdruck erkannt werden (36). Im vorliegenden Studiendesign wurde der Injektionsdruck nicht evaluiert und muss daher als limitierender Faktor angesehen werden. Eine Abhängigkeit des Injektionsdrucks könnte im Weiteren eine mögliche Erklärung sein, dass 8 der 40 Nerven aus Gruppe R und B ohne jegliche Schädigung blieben. Im Sinne des Barotraumas wäre diese Beobachtung so erklärbar, dass jene Nerven unter sehr geringem Injektionsdruck infiltriert wurden. Eine extraneurale Lage der Nadelspitze kann dabei durch das standardisierte in-situ-Vorgehen mit ausreichender Sicherheit ausgeschlossen werden. Bisher steht jedoch keine Methode zur Verfügung, die v.a. in der klinischen Alltagssituation sicher zwischen intrafaszikulärer und stromaler Nadellage differenzieren kann.

Bezogen auf die statistische Auswertung muss berücksichtigt werden, dass in Relation zum seltenen Vorkommen neurologischer Beschwerden in der Klinik, die Fallzahl vermutlich zu niedrig gewählt wurde, um überhaupt ausreichend häufig histologische Veränderungen beobachten zu können (7;8;15;21;29;81). Die Untersuchung einer höheren Nervenanzahl hätte durchaus eine signifikant deutlichere Schädigung durch Bupivacain gegenüber der Ringerlösung aufweisen können. Dennoch konnten auch unter den 40 manipulierten Nerven in dieser Studie mehrere schwere Nervenschäden nachgewiesen werden.



#### 4.4 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten wegen der beschriebenen Limitationen durch weitere Studien mit entsprechenden methodischen Vorgaben ergänzt werden. Im Vordergrund stünde dabei die histologisch-neurologische Korrelation. Entscheidend für den klinischen Alltag in der Regionalanästhesie ist die Vermeidung von postinterventionellen neurologischen Komplikationen im Sinne der Patientensicherheit. Dies betrifft einerseits passagere, besonders aber persistierende Beschwerden.

Im Mittelpunkt der Nervenschädigungen steht, wie auch in dieser Untersuchung gezeigt, eine traumatisch bedingte, lokale, sterile Neuritis, die bis zur Schädigung der Myelinscheide reichen kann. Die Injektion des Lokalanästhetikums stellt den abschließenden Schritt eines Nervenblockadeverfahrens dar. Dem geht das Aufsuchen der Zielstrukturen voraus, wobei die Stimulationsnadel je nach Schliff und Einstichrichtung eine lokal begrenzte, sterile Neuritis in unterschiedlichem Ausmaß hervorrufen könnte, sofern das Nervengewebe dabei penetriert wird. Dies könnte einerseits durch den Elektroimpuls, andererseits durch die Punktion geschehen. Auch für diese Interventionen würde sich der hier verwendete histologische Trauma-Score wegen seiner Kontrollmöglichkeiten, der Erfassung sämtlicher Schadensentitäten und der Reproduzierbarkeit eignen (86;87).

Sinnvoll wäre, das vorliegende Studiendesign um eine Injektionsdruckmessung zu erweitern, da der Einfluss des Injektionsdrucks bezüglich Nervenläsionen bisher nicht zufriedenstellend geklärt werden konnte (36;42;58). Außerdem wäre ein Vergleich mit anderen Lokalanästhetika unterschiedlicher relativer Toxizität und Dosierung hilfreich, um die Relevanz neurotoxischer Effekte besser beurteilen zu können.

#### 4.5 Schlussfolgerungen für die klinische Praxis

Mit der vorliegenden Studie wird gezeigt, dass nicht nur Lokalanästhetika, sondern auch physiologische Lösungen, Nervenschäden nach intraneuraler Applikation auslösen können. Dabei werden eine durch das Trauma ausgelöste Inflammation und Myelinschädigungen beobachtet. Schäden durch Ringerlösung sind denen von Bupivacain bei Verwendung kleiner Injektionsvolumina gleichwertig. Die klinische Annahme, Lokalanästhetika intraneural zu applizieren sei unbedenklich (11), konnte in

dieser Studie widerlegt werden. Allerdings wurden einige wenige mögliche Einflussfaktoren nicht kontrolliert, durch deren Berücksichtigung eine intraneurale Injektion ohne Nervenschädigung bleiben könnte (36). Festzuhalten bleibt, dass unter dem gängigen klinischen Procedere eines Nervenblockadeverfahrens in etwa 12% der Fälle mit schweren Nervenschäden auf histologischer Ebene gerechnet werden muss, sofern es zu einer intraneuralen Injektion kommt. Hinweise, dass derartige Schäden neurologische Funktionsstörungen auslösen könnten, liegen vor (2;27;63), bedürfen aber weiterer Erforschung. Im Sinne einer Empfehlung für die klinische Praxis sollte bis auf Weiteres der Vorsatz beibehalten werden, intraneurale Injektionen mit größtmöglicher Sicherheit während der Durchführung einer Nervenblockade zu vermeiden.

## 5. Zusammenfassung

**Einleitung:** Durch Anwendung der Ultraschalltechnik während der Durchführung von peripheren Nervenblockadeverfahren können die Position der Nadelspitze und die Verteilung des injizierten Lokalanästhetikums bildlich dargestellt werden. Klinische Daten, ob durch eine intraneurale Injektion neurologische Symptome bzw. Nervenschäden verursacht werden, existieren nur begrenzt. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es herauszufinden, ob die intraneurale Injektion isotonischer Ringerlösung geringere Nervenschäden verursacht als ein potenziell neurotoxisches Lokalanästhetikum.

**Material und Methoden:** Bei sieben anästhesierten Hausschweinen wurde an insgesamt 40 Nerven am offenen axillären Plexus brachialis 2ml Bupivacain 0,5% (n=20) oder Ringerlösung (n=20) intraneural injiziert. 54 Nerven inklusive Kontrollen wurden 48 Stunden nach Versuchsbeginn exzidiert. Es folgte eine histologische Auswertung der Präparate nach inflammatorischen Zellen (HE-, CD68-Antikörper-Färbung), Myelinschäden (Kluver-Barrera-Färbung) und intraneuralen Hämatomen. Die Schädigung wurde anhand eines histologischen Scores graduiert mit 0 (kein Schaden) bis 4 (schwerer Schaden).

**Ergebnisse:** In der statistischen Analyse zeigten die Interventionsgruppen signifikante Nervenschäden gegenüber den Negativkontrollen ( $p=0,02$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Ringer-Gruppe und der Bupivacain-Gruppe konnte nicht gefunden werden [Median (25. Perzentil/75. Perzentil): Ringer 1 (0,5/2); Bupivacain 1 [1/1,5];  $p=0,77$ ]. Inflamationszeichen waren in beiden Gruppen vergleichbar ausgeprägt. Myelinschäden (Score-Wert 4) wurden in 12,5% aller Fälle unabhängig von der verwendeten Substanz beobachtet.

**Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Studie wurde kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der provozierten Nervenschäden und der zur Injektion verwendeten Substanz gefunden. Nervenläsionen traten dabei in Form von posttraumatischer Inflammation und Myelinschädigung auf. Im Zusammenhang mit bisherigen Untersuchungen kann ein Volutrauma ausgelöst durch intraneurale Injektion als ein wichtiger Trigger für Nervenschäden angesehen werden.

## 6. Summary

**Introduction:** Due to application of ultrasound needle tip localization and the distribution of local anaesthetics during injection can be visualized when performing peripheral nerve blocks. Clinical data whether the injection in the intraneural space may cause neurological symptoms or particularly nerve injury are limited. The aim of this study was to challenge the hypothesis that the application of isotonic Ringer's solution causes fewer nerve injury compared to the injection of local anaesthetics in the intraneural space due to major toxicity.

**Material and methods:** Intraneural injection was applied in 7 anaesthetized pigs to a total of 40 brachial plexus nerves. In each animal up to 6 exposed plexus nerves underwent an injection in the intraneural space. Either a volume of 2 ml of bupivacain 0.5% or Ringer's solution was applied. After 48 hours of maintaining general anaesthesia 54 nerves including negative and positive controls were resected. The specimens were processed for visual examination and the detection of inflammatory cells (haematoxylin eosin, i.e. CD68-immunohistochemistry for visualisation of macrophages), myelin damage (Kluver-Barrera staining), and intraneural haematoma. Considering myelin, haematoma and inflammatory cells, the grade of nerve injury was scored ranging from 0 (no injury) to 4 (severe injury).

**Results:** Statistical analysis showed significant nerve lesions in the interventional groups compared to the negative controls ( $p=0.02$ ). According to the applied injury score, there was no significant difference between the bupivacaine group [median (interquartile range) 1 (1–1.5)] and the Ringer's group [1 (0.5–2)  $p=0.77$ ]. The occurrence of posttraumatic regional inflammation was directly related to the applied interventions. Myelin damage (Score value 4) was found in 12.5% of the examined specimens irrespective of the applied substance.

**Conclusion:** In the present study, the magnitude of nerve injury following intraneural injection was not related to the applied type of substance. Posttraumatic inflammation and structural damage of nerve tissue were notable signs of nerve injury after intraneural injection. According to the present data a volutrauma due to intraneural injection can be designated an important trigger for nerve injury.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) Adams HJ, Kronberg GH, Takman BH. Local anesthetic activity and acute toxicity of ( )-2-(N-ethylpropylamino)-2',6'-butyroxylidide, a new long-acting agent. *J Pharm Sci* 1972 Nov;61(11):1829-31.
- (2) Aguilar JL, Pelaez R. Transient neurological syndrome: does it really exist? *Curr Opin Anaesthesiol* 2004 Oct;17(5):423-6.
- (3) Aguirre J, Ruland P, Ekatodramis G, Borgeat A. Ultrasound does not improve clinical outcome compared with neurostimulation. *Reg Anesth Pain Med* 2009 Nov;34(6):621-2.
- (4) Aktories K, Förstermann U. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. ed. Urban & Fischer; 2009.
- (5) Al-Nasser B. Local toxicity of local anaesthetics--do experimental data apply to clinical manifestations? *Anaesthesia* 2002 Dec;57(12):1236-7.
- (6) Attwood D, Fletcher P. Self-association of local anaesthetic drugs in aqueous solution. *J Pharm Pharmacol* 1986 Jul;38(7):494-8.
- (7) Auroy Y, Benhamou D, Bargues L, Ecoffey C, Falissard B, Mercier FJ, et al. Major complications of regional anesthesia in France: The SOS Regional Anesthesia Hotline Service. *Anesthesiology* 2002 Nov;97(5):1274-80.
- (8) Auroy Y, Narchi P, Messiah A, Litt L, Rouvier B, Samii K. Serious complications related to regional anesthesia: results of a prospective survey in France. *Anesthesiology* 1997 Sep;87(3):479-86.
- (9) Bartussek E, Fatehi S, Motsch J, Grau T. [Survey on practice of regional anaesthesia in Germany, Austria, and Switzerland. Part 1: Quality assurance and training concepts]. *Anaesthesist* 2004 Sep;53(9):836-46.
- (10) Ben-David B, Barak M, Katz Y, Stahl S. A retrospective study of the incidence of neurological injury after axillary brachial plexus block. *Pain Pract* 2006 Jun;6(2):119-23.
- (11) Bigeleisen PE. Nerve puncture and apparent intraneural injection during ultrasound-guided axillary block does not invariably result in neurologic injury. *Anesthesiology* 2006 Oct;105(4):779-83.
- (12) Boecker W, Denk H, Heitz P. Pathologie. 4. ed. Urban & Fischer; 2008.
- (13) Borgeat A. Regional anesthesia, intraneural injection, and nerve injury: beyond the epineurium. *Anesthesiology* 2006 Oct;105(4):647-8.
- (14) Borgeat A, Blumenthal S. Nerve injury and regional anaesthesia. *Curr Opin Anaesthesiol* 2004 Oct;17(5):417-21.
- (15) Borgeat A, Ekatodramis G, Kalberer F, Benz C. Acute and nonacute complications associated with interscalene block and shoulder surgery: a prospective study. *Anesthesiology* 2001 Oct;95(4):875-80.
- (16) Boven L, Van Meurs M. Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. 2006. *Brain*.  
Ref Type: Generic

- 
- (17) Brandt L. *Illustrierte Geschichte der Anästhesie*. 1. ed. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.; 1997.
- (18) Bruck W. Liposome-mediated monocyte depletion during Wallerian Degeneration defines the role of hematogenous phagocytes in myelin removal. 1996. *J Neurosci Res*.  
Ref Type: Generic
- (19) Brull R, Chan VW, McCartney CJ, Perlas A, Xu D. Ultrasound detects intraneural injection. *Anesthesiology* 2007 Jun;106(6):1244.
- (20) Brull R, Lupu M, Perlas A, Chan VW, McCartney CJ. Compared with dual nerve stimulation, ultrasound guidance shortens the time for infraclavicular block performance. *Can J Anaesth* 2009 Nov;56(11):812-8.
- (21) Brull R, McCartney CJ, Chan VW, El-Beheiry H. Neurological complications after regional anesthesia: contemporary estimates of risk. *Anesth Analg* 2007 Apr;104(4):965-74.
- (22) Chan VW, Perlas A, McCartney CJ, Brull R, Xu D, Abbas S. Ultrasound guidance improves success rate of axillary brachial plexus block. *Can J Anaesth* 2007 Mar;54(3):176-82.
- (23) Cheney FW, Domino KB, Caplan RA, Posner KL. Nerve injury associated with anesthesia: a closed claims analysis. *Anesthesiology* 1999 Apr;90(4):1062-9.
- (24) Coleman M, Perry VH. Axon pathology in neurological disease: A neglected therapeutic target. 2002. *Trends Neuroscience*.  
Ref Type: Generic
- (25) De Andres J,onso-Inigo JM, Sala-Blanch X, Reina MA. Nerve stimulation in regional anesthesia: theory and practice. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2005 Jun;19(2):153-74.
- (26) Eliav E, Benoliel R, Tal M. Inflammation with no axonal damage of the rat saphenous nerve trunk induces ectopic discharge and mechanosensitivity in myelinated axons. *Neurosci Lett* 2001 Sep 21;311(1):49-52.
- (27) Eliav E, Herzberg U, Ruda MA, Bennett GJ. Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. *Pain* 1999 Nov;83(2):169-82.
- (28) Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, et al. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol* 1993 May;142(5):1359-72.
- (29) Fanelli G, Casati A, Garancini P, Torri G. Nerve stimulator and multiple injection technique for upper and lower limb blockade: failure rate, patient acceptance, and neurologic complications. Study Group on Regional Anesthesia. *Anesth Analg* 1999 Apr;88(4):847-52.
- (30) Fink BR. Acute and chronic toxicity of local anaesthetics. *Can Anaesth Soc J* 1973 Jan;20(1):5-16.
- (31) Gaboury JP, Johnston B. Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo. 1995. *J. Immunol*.  
Ref Type: Generic
- (32) George A, Schmidt C. Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. 1999. *Exp Neurol*.  
Ref Type: Generic
- (33) George R, Griffin JW. Delayed macrophage responses and myelin clearing during Wallerian Degeneration in the central nervous system: The dorsal radiculotomy model. 1994. *Exp*

Neurol.

Ref Type: Generic

- (34) Grill MF, Maganti R. Cephalosporin-induced neurotoxicity: clinical manifestations, potential pathogenic mechanisms, and the role of electroencephalographic monitoring. *Ann Pharmacother* 2008 Dec;42(12):1843-50.
- (35) Hack CE. A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells. 1997. *Immunol Today*.  
Ref Type: Generic
- (36) Hadzic A, Dilberovic F, Shah S, Kulenovic A, Kapur E, Zaciragic A, et al. Combination of intraneural injection and high injection pressure leads to fascicular injury and neurologic deficits in dogs. *Reg Anesth Pain Med* 2004 Sep;29(5):417-23.
- (37) Johnson EM, Ludlum DB. Aggregation of local anesthetics in solution. *Biochem Pharmacol* 1969 Oct;18(10):2675-7.
- (38) Kalichman MW. Physiologic mechanisms by which local anesthetics may cause injury to nerve and spinal cord. *Reg Anesth* 1993 Nov;18(6 Suppl):448-52.
- (39) Kalichman MW, Moorhouse DF, Powell HC, Myers RR. Relative neural toxicity of local anesthetics. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993 May;52(3):234-40.
- (40) Kalichman MW, Powell HC, Myers RR. Pathology of local anesthetic-induced nerve injury. *Acta Neuropathol* 1988;75(6):583-9.
- (41) Kalichman MW, Powell HC, Myers RR. Quantitative histologic analysis of local anesthetic-induced injury to rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther* 1989 Jul;250(1):406-13.
- (42) Kapur E, Vuckovic I, Dilberovic F, Zaciragic A, Cosovic E, Divanovic KA, et al. Neurologic and histologic outcome after intraneural injections of lidocaine in canine sciatic nerves. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007 Jan;51(1):101-7.
- (43) Karanth S, Yang G. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian Degeneration of peripheral nerves. 2006. *Experimental Neurology*.  
Ref Type: Generic
- (44) Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 2001 Jun;64(2):109-27.
- (45) Kitagawa N, Oda M, Totoki T. Possible mechanism of irreversible nerve injury caused by local anesthetics: detergent properties of local anesthetics and membrane disruption. *Anesthesiology* 2004 Apr;100(4):962-7.
- (46) KLUVER H, BARRERA E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 1953 Oct;12(4):400-3.
- (47) Kochs E, Adams HA. *Anästhesiologie*. 2. ed. Stuttgart: Thieme; 2009.
- (48) Koscielniak-Nielsen ZJ. Ultrasound-guided peripheral nerve blocks: what are the benefits? *Acta Anaesthesiol Scand* 2008 Jul;52(6):727-37.
- (49) Lambert LA, Lambert DH, Strichartz GR. Irreversible conduction block in isolated nerve by high concentrations of local anesthetics. *Anesthesiology* 1994 May;80(5):1082-93.
- (50) Larsen R. *Anästhesie*. 9. ed. München: Urban & Fischer; 2010.

- 
- (51) Lee H, Jo EK. Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: Implications in Wallerian Degeneration. 2006. Biochemical and Biophysical Research Communications.  
Ref Type: Generic
- (52) Leone S, Di CS, Casati A, Fanelli G. Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. *Acta Biomed* 2008 Aug;79(2):92-105.
- (53) Leskova A, Moriarty LJ, Turek JJ, Schoenlein IA, Borgens RB. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. *J Exp Biol* 2000 Jun;203(Pt 12):1783-95.
- (54) Lirk P, Haller I, Colvin HP, Lang L, Tomaselli B, Klimaschewski L, et al. In vitro, inhibition of mitogen-activated protein kinase pathways protects against bupivacaine- and ropivacaine-induced neurotoxicity. *Anesth Analg* 2008 May;106(5):1456-64, table.
- (55) Lirk P, Haller I, Myers RR, Klimaschewski L, Kau YC, Hung YC, et al. Mitigation of direct neurotoxic effects of lidocaine and amitriptyline by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Anesthesiology* 2006 Jun;104(6):1266-73.
- (56) Liu H, Shiryayev SA, Chernov AV, Kim Y, Shubayev I, Remacle AG, et al. Immunodominant fragments of myelin basic protein initiate T cell-dependent pain. *J Neuroinflammation* 2012;9:119.
- (57) Lüllmann-Rauch R. Histologie, Verstehen-Lernen-Nachschlagen. 2003.
- (58) Lupu CM, Kiehl TR, Chan VW, El-Beheiry H, Madden M, Brull R. Nerve expansion seen on ultrasound predicts histologic but not functional nerve injury after intraneural injection in pigs. *Reg Anesth Pain Med* 2010 Mar;35(2):132-9.
- (59) Marhofer P, Chan VW. Ultrasound-guided regional anesthesia: current concepts and future trends. *Anesth Analg* 2007 May;104(5):1265-9, tables.
- (60) Marhofer P, Greher M, Kapral S. Ultrasound guidance in regional anaesthesia. *Br J Anaesth* 2005 Jan;94(1):7-17.
- (61) Martini R, Fischer S, Lopez-Vales R, David S. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* 2008 Nov 1;56(14):1566-77.
- (62) Mekoni JA. mast cells in innate immunity. 2000. *Immunol. Rev.*  
Ref Type: Generic
- (63) Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 2006 Aug;51(2):240-64.
- (64) Moayeri N, Bigeleisen PE, Groen GJ. Quantitative architecture of the brachial plexus and surrounding compartments, and their possible significance for plexus blocks. *Anesthesiology* 2008 Feb;108(2):299-304.
- (65) Moore DC. Toxic effects of local anesthetics. *JAMA* 1978 Aug 4;240(5):434.
- (66) Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ. Clinical Anesthesiology. 4. 2006. New York, Lange Medical Books.  
Ref Type: Generic



- (67) Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. 1996. Immunol. Today.  
Ref Type: Generic
- (68) Mueller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, et al. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. Lab Invest 2003 Feb;83(2):175-85.
- (69) Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. Am J Pathol 2001 Dec;159(6):2187-97.
- (70) Myers RR, Kalichman MW, Reisner LS, Powell HC. Neurotoxicity of local anesthetics: altered perineurial permeability, edema, and nerve fiber injury. Anesthesiology 1986 Jan;64(1):29-35.
- (71) Park CJ, Park SA, Yoon TG, Lee SJ, Yum KW, Kim HJ. Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line. J Dent Res 2005 Sep;84(9):852-7.
- (72) Reimers H. Der Plexus brachialis des Haussäugetiere. Eine vergleichende anatomische Studie. Anatomie und Embryologie. 1924.
- (73) Sala B, X, Lopez AM, Carazo J, Hadzic A, Carrera A, Pomes J, et al. Intraneural injection during nerve stimulator-guided sciatic nerve block at the popliteal fossa. Br J Anaesth 2009 Jun;102(6):855-61.
- (74) Sala-Blanch X, Lopez AM, Pomes J, Valls-Sole J, Garcia AI, Hadzic A. No clinical or electrophysiologic evidence of nerve injury after intraneural injection during sciatic popliteal block. Anesthesiology 2011 Sep;115(3):589-95.
- (75) Sala-Blanch X, Ribalta T, Rivas E, Carrera A, Gaspa A, Reina MA, et al. Structural injury to the human sciatic nerve after intraneural needle insertion. Reg Anesth Pain Med 2009 May;34(3):201-5.
- (76) Sawada T, Sano M. Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry. 2007. Neuroscience.  
Ref Type: Generic
- (77) Sawynok J. Involvement of mast cells, sensory afferents and sympathetic mechanisms in paw oedema induced by adenosine A(1) and A(2B/3) receptor agonists. 2000. Eur J Pharmacol.  
Ref Type: Generic
- (78) Scott DB. Evaluation of the toxicity of local anaesthetic agents in man. Br J Anaesth 1975 Jan;47(1):56-61.
- (79) Selander D, Brattsand R, Lundborg G, Nordborg C, Olsson Y. Local anesthetics: importance of mode of application, concentration and adrenaline for the appearance of nerve lesions. An experimental study of axonal degeneration and barrier damage after intrafascicular injection or topical application of bupivacaine (Marcain). Acta Anaesthesiol Scand 1979 Apr;23(2):127-36.
- (80) Selander D, Dhuner KG, Lundborg G. Peripheral nerve injury due to injection needles used for regional anesthesia. An experimental study of the acute effects of needle point trauma. Acta Anaesthesiol Scand 1977;21(3):182-8.
- (81) Selander D, Edshage S, Wolff T. Paresthesiae or no paresthesiae? Nerve lesions after axillary blocks. Acta Anaesthesiol Scand 1979 Feb;23(1):27-33.

- 
- (82) Sisson S, Grossmann JD. The anatomy of the domestic animal. 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1953.
- (83) Sites BD, Beach ML, Spence BC, Wiley CW, Shiffrin J, Hartman GS, et al. Ultrasound guidance improves the success rate of a perivascular axillary plexus block. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006 Jul;50(6):678-84.
- (84) Sorenson EJ. Neurological injuries associated with regional anesthesia. *Reg Anesth Pain Med* 2008 Sep;33(5):442-8.
- (85) Steinfeldt T, Graf J, Vassiliou T, Nimphius W, Sturm K, Kill C, et al. Systematic evaluation of the highest current threshold for regional anaesthesia in a porcine model. *Acta Anaesthesiol Scand* 2010 Jul;54(6):770-6.
- (86) Steinfeldt T, Nimphius W, Werner T, Vassiliou T, Kill C, Karakas E, et al. Nerve injury by needle nerve perforation in regional anaesthesia: does size matter? *Br J Anaesth* 2010 Feb;104(2):245-53.
- (87) Steinfeldt T, Nimphius W, Wurps M, Eberhart L, Vassiliou T, Kill C, et al. Nerve perforation with pencil point or short bevelled needles: histological outcome. *Acta Anaesthesiol Scand* 2010 Sep;54(8):993-9.
- (88) Swindle MM, Smith AC, Hepburn BJ. Swine as models in experimental surgery. *J Invest Surg* 1988;1(1):65-79.
- (89) Takahashi M, Kawaguchi M. Cyclooxygenase-2 expression in Schwann cells and macrophages in the sciatic nerve after single spinal nerve injury in rats. 2004. *Neurosci Lett*.  
Ref Type: Generic
- (90) Trepel M. Neuroanatomie, Struktur und Funktion. 3 ed. Urban & Fischer; 2004.
- (91) Vassiliou T, Eider J, Nimphius W, Wiesmann T, De AJ, Muller HH, et al. Dual guidance improves needle tip placement for peripheral nerve blocks in a porcine model. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012 Oct;56(9):1156-62.
- (92) Welsch U. Lehrbuch Histologie. 3 ed. Urban & Fischer; 2010.
- (93) Whitlock EL, Brenner MJ, Fox IK, Moradzadeh A, Hunter DA, Mackinnon SE. Ropivacaine-induced peripheral nerve injection injury in the rodent model. *Anesth Analg* 2010 Jul;111(1):214-20.
- (94) Yamashita A, Matsumoto M, Matsumoto S, Itoh M, Kawai K, Sakabe T. A comparison of the neurotoxic effects on the spinal cord of tetracaine, lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine administered intrathecally in rabbits. *Anesth Analg* 2003 Aug;97(2):512-9, table.
- (95) Yang S, Abrahams MS, Hurn PD, Grafe MR, Kirsch JR. Local anesthetic Schwann cell toxicity is time and concentration dependent. *Reg Anesth Pain Med* 2011 Sep;36(5):444-51.
- (96) Zink W, Graf BM. [Toxicology of local anesthetics. Clinical, therapeutic and pathological mechanisms]. *Anaesthesist* 2003 Dec;52(12):1102-23.
- (97) Zink W, Graf BM. The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. *Curr Opin Anaesthesiol* 2008 Oct;21(5):645-50.

## Anhang

### A) Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Makroskopische Anatomie des humanen Plexus brachialis .....	3
Abbildung 2	Histologische Systematik eines peripheren Nerven.....	6
Abbildung 3	Molekulare Grundstruktur der beiden pharmakologischen Hauptgruppen der Lokalanästhetika am Bsp. Procain und Lidocain.....	9
Abbildung 4	Regio axillaris .....	21
Abbildung 5	Regio cruris posterior .....	22
Abbildung 6	Axilläre Nerven nach bzw. während der Injektion .....	24
Abbildung 7	Maximal traumatisierter N. tibialis durch zweiseitige Ligatur .....	24
Abbildung 8.1	Schadensgraduierung in der HE-Färbung.....	36
Abbildung 8.2	Schadensgraduierung in der HE-Färbung.....	37
Abbildung 9.1	Myelinschäden in der Kluver-Barrera-Färbung .....	38
Abbildung 9.2	Myelinschäden in der Kluver-Barrera-Färbung .....	39
Abbildung 10	Nachweis inflammatorischer Zellen durch CD68-Antikörper.....	40
Abbildung 11	Ergebnisse des histologischen Trauma-Scores.....	41
Tabelle 1	Vergleich des humanen und porcinen infraclaviculären Plexus brachialis...4	
Tabelle 2	Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin.....	29
Tabelle 3	Färbeprotokoll Kluver-Barrera.....	29
Tabelle 4	Färbeprotokoll Immunhistochemie.....	30
Tabelle 5	Der histologische Trauma-Score.....	31
Tabelle 6	Übersicht zur Verteilung der einzelnen Schadensentitäten auf die jeweiligen Versuchsgruppen. ....	35
Tabelle 7	Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests und des U-Tests nach Wilcoxon-Mann-Whitney. ....	42

---

**B) Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AMV	Atemminutenvolumen
Aqua dest.	Aqua destillata
Bsp.	Beispiel
bspw.	beispielsweise
CD68	Differenzierungskluster 68 (Cluster of Differentiation)
Charr.	Charrière (= French; = 0,333 mm)
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
EIA	Enzymgekoppelter Immunadsorbtionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EKG	Elektrokardiogramm/ -graphie
etCO <sub>2</sub>	endtidal gemessener Kohlendioxidpartialdruck
F <sub>c</sub>	konstante Proteinfraction eines Antikörpers
G	Gauge
h	Stunde (hour)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HWZ	Halbwertszeit
i. d. R.	In der Regel
IL-n	Interleukin-n
INF-γ	Interferon- γ
iNOS	induzierbare Stickstoffoxid-Synthetase
KB	Kluver-Barrera
kDa	Kilodalton (1000 g/mol)
M.	Musculus
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches-Protein-1
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
min	Minute

---

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol/L	Millimol pro Liter, millimolar
MPS	monozytäres Phagozytosesystem
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
PAW	Atemwegsdruck (pressure of airway)
PCV	pressure controlled ventilation
pH	potenzia hydrogenii, Konzentrationsmaß der Säure-Basen-Äquivalente einer wässrigen Lösung
pK <sub>a</sub>	Säurekonstante einer Substanz in wässriger Lösung
s.	siehe
sog.	sogenannt (oder grammatisch abgewandelte Formen)
SpO <sub>2</sub>	partielle Sauerstoffsättigung (im Blut)
T <sub>C</sub>	Killerzellen, Subpopulation von T-Lymphozyten des erworbenen Immunsystems
T <sub>H</sub>	Helferzellen, Subpopulation von T-Lymphozyten des erworbenen Immunsystems
Tab.	Tabelle
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Vgl.	Vergleich
u. a.	und andere (oder grammatisch abgewandelte Formen)
u. U.	unter Umständen
z. T.	zum Teil
µg/kg	Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht

## **C) Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren:

### In Marburg

Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Becker, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Eggert, Eilers, Feuser, Graf, Gress, Grzeschik, Gudermann, Haupt, Hertl, Höffken, Hofmann, Holland, Hoyer, Hundt, Kann, Kircher, Klose, Koch, Kohlmann, Leer, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Maisch, Maisner, Medeiros, Maier, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Neumüller, Nimphius, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Pressel, Ramaswamy, Reese, Renz, Richter, Röhm, Rominger, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Samland, Schäfer, Schmidt, Schulze, Secundo, Seitz, Sevinc, Sitzler, Steinfeldt, Steinkamp, Straßmann, Suske, Teymoortash, Vasilliou, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

### In Fulda

Grimme, Günther, Hellinger, Hessmann, Kaufmann, König, Melzer, Rüttger, Stauch.

### In Kassel

Bózsik, Eulitz, Hillejan, Höpfner, Hummel, Löser, Steinbrück, Wellhöner.

### In Salzburg

Covi, Eder, Sperl, Weghuber.

## D) Danksagung

Diese Arbeit ist nur mit Unterstützung zahlreicher Menschen möglich geworden. Daher möchte ich standesgemäß einige Personen erwähnen, die stellvertretend auch für diejenigen genannt sind, die ihren Namen hier vermissen. Euch und ihnen allen sei gewiss, dass ich überaus dankbar bin für jegliche Anteilnahme an dieser Promotion.

Danken möchte ich:

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Thorsten Steinfeldt, für die Ermöglichung und die allseits gute Betreuung in allen Phasen der Vorbereitung und Ausarbeitung meines Promotionsvorhabens.

Dr. Wilhelm Nimphius und Dr. Thomas Wiesmann, häufige Diskussionspartner, wodurch ich mein wissenschaftliches Verständnis und Hintergrundwissen wesentlich vertiefen konnte. Danke, Jungs.

Herrn Andreas Gockel, hervorragender Anästhesiepfleger, ohne den der experimentelle Teil der Arbeit im Tier-OP nicht durchführbar gewesen wäre. Für Tipps und Tricks des Anästhesie- und Forschungsalltags ist man bei ihm an der richtigen Adresse. Hat Spaß gemacht.

Den Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe, für alles Beratschlagen und alle Zusammenarbeit immer dann, wenn es nötig war. Allen voran aber Sabine Pöschl, durch die der erste Kontakt zur Arbeitsgruppe zustande kam.

Meiner Familie, die nicht nur in Belangen meiner medizinischen Ausbildung ein guter Rückhalt war und ist. Euch und allen Freunden danke ich für das regelmäßige Nachfragen und Interesse nicht nur an dieser Arbeit, was mich auf dem Weg immer wieder motiviert hat, es wirklich zu Ende zu bringen. Dabei Fachspezifisches in die Alltagswelt von Nicht-Medizinern zu übersetzen half mir, die Rolle medizinischer Forschung aus vielerlei Perspektiven zu betrachten, was mir ein Gewinn mit Blick auf meine ärztliche Tätigkeit war und ist. Der Titel steht zwar nur vor meinem Namen, aber einen gewissen Anteil daran hat jeder von euch.

Herzlichen Dank.